

M.H

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 99/7055



4

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

## Bescheinigung

Herr Hassan Joost in Gießen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mittel zur Hemmung des 1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat-  
Pathways zur Therapie von Infektionskrankheiten"

am 22. September 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 7. Oktober 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Joost".

Aktenzeichen: 198 43 279.8

Joost

11.06.11.99

Hassan Jomaa, Gießen

15362

Mittel zur Hemmung des 1-Deoxy-D-xylose-5-phosphat-Pathways  
zur Therapie von Infektionskrankheiten

Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Therapie von parasitären Erkrankungen verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Weiter betrifft die Erfindung Proteine, sowie Teilstücke von Proteinen, ferner DNA-Sequenzen, die für diese Proteine bzw. für Teilstücke dieser Proteine kodieren, sowie die Verwendung dieser DNA-Sequenzen, dieser Proteine oder ihrer Teilstücke zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen ein- oder mehrzellige Parasiten.

Der Begriff Parasiten beinhaltet einzellige Parasiten, Protozoen, und mehrzellige Parasiten einschließlich Helminthen und Anthropoden. Diese verursachen Infektionserkrankungen bei Mensch und Tier.

Es existiert bereits eine Vielzahl von Mitteln gegen parasitäre Erkrankungen. Die vorhandenen Mittel werden durch die sich rasch entwickelnden Resistenzen gegen diese Mittel bereits unbrauchbar für die Therapie von Mensch und Tier. So sind bereits viele Regionen von Malaria Parasiten befallen, die gegen Standard-Medikamente wie Chloroquin resistent sind. Auch sind Berichte über Resistenz-Entwicklung

gegen Standard-Mittel (Praziquantel) zur Behandlung der Bilharziose bekannt. Diese Resistenzentwicklungen und andere Faktoren haben dazu geführt, daß Malaria und Bilharziose bereits zu den häufigsten Erkrankungen in den Tropen gezählt werden. Geschätzte 300-500 Millionen Menschen sind an Malaria erkrankt. 2-2.5 Millionen Menschen sterben im Jahr an Malaria. Weiter sind neue Medikamente wie Mefloquin sehr teuer in der Herstellung und sehr nebenwirkungsreich. Es besteht ein großer Bedarf an Arzneimittel zur Therapie von Mensch und Tier.

Es gab in der Vergangenheit viele Ansätze zur Entwicklung von Chemotherapeutika gegen Parasiten, insbesondere gegen Krankheitserreger der Malaria und der Bilharziose. Einer dieser Ansätze befaßt sich mit der Inhibition der sogenannten Isoprenoidbiosynthese. Isoprenoide sind Moleküle, die aus einzelnen Isopreneinheiten (Isopentenyl-Diphosphat) gebildet werden, und wichtige Funktionen in der Zelle übernehmen. Hierzu gehören Sterole, Ubichinone und andere Moleküle, die für den Haushalt der Parasiten wichtig sind. Die Vorgehensweise basierte hierbei auf einem Modell, bei dem in Pilze und in Säugerzellen etabliert wurde. In Pilzen und in Säugerzellen entsteht die Untereinheit Isopentenyl-diphosphat auf der Basis der Kondensation von drei Molekülen Acetyl-CoA zu HMG-CoA. HMG-CoA wird dann von der HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat umgewandelt, welches dann zu Isopentenyl-diphosphat umgewandelt wird mit Mevalonat-Phosphat als Zwischenstufe. Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase wie zum Beispiel Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin wurden zur Inhibition des Wachstums der Parasiten verwendet. Bei Malaria gelang es zwar, unter Anwendung sehr hoher Dosen Lovastatin und Simvastatin eine *in vitro* Inhibition zu erreichen, jedoch mißlang die Inhibition *in vivo*.

Die Behandlung Schistosoma-infizierter Mäuse mit Lovastatin führte zu einer Inhibition der Eiablage dieser Würmer, jedoch mußten sehr hohe Konzentrationen an Lovastatin aufgewendet werden, um einen Teil der Würmer *in vivo* zu töten.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Parasiten, insbesondere ~~Plasmodien und Trypanosomen (Verursacher der Malaria und der Schlafkrankheit)~~ zumindest einen weiteren Stoffwechselweg zur Synthese von Isoprenoiden besitzen.

Dieser Stoffwechselweg beruht auf einer Kondensation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP). DOXP wird dann umgewandelt zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, das dann zu Isopentenyldiphosphat umgewandelt wird mit 2-C-Methyl-erythrose-4-phosphat als Zwischenstufe. Dieser Stoffwechselweg besteht unter anderem aus den Enzymen DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase (Siehe Figur 7). Dieser Stoffwechselweg war bisher nur in Pflanzen, in Algen und in einigen Bakterien beschrieben worden (Sprenger et al. PNAS, 94 (1997) 12857-62 und Kuzuyama et al. Tetrahedron Letters 39 (1998) 4509-12).

Die Inhibition des oben beschriebenen DOXP-Stoffwechselwegs, insbesondere der Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase durch die dem Fachmann bekannten Techniken eignet sich zur Vorbeugung und Behandlung von Infektionen, verursacht durch ein- und mehrzellige Parasiten bei Mensch und Tier. Da dieser Stoffwechselweg nicht im Menschen vorhanden ist, eignet er sich hervorragend als Ziel für eine gezielte Chemotherapie von Parasiten. Insbesondere eignen sich die Enzyme Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthetase und Deoxyxylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase als Ziel für eine Chemotherapie. Besonders nebenwirkungsarm und geeignet

zeigte sich die Inhibition des Enzyms Deoxyxylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase von Malaria, da der Mensch weder über Substrate und deren Vorstufen noch über Produkt des Enzyms noch über das Enzym selbst verfügt.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und neue Mittel, die den DOXP-Stoffwechselweg hemmen und deren Anwendung zur Therapie von Infektionskrankheiten verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten.

Die Erfindung hat das Ziel, ein neues Mittel zur Therapie von parasitären Erkrankungen bei Mensch und Tier bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zur Grunde, ein Medikament zu entwickeln, das selektiv den Erreger abtötet und nebenwirkungsarm ist.

Diese Erfindung wird gemäß Anspruch 1 realisiert. Die Erfindungsverfahren und Erfindungsmittel sind dadurch gekennzeichnet, daß sie

- die Isoprenoidbiosynthese im sogenannten 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg hemmen.

Alle beschriebenen Stoffwechselwege sind nicht in Mensch und Tier vorhanden, sondern nur in Pflanzen, Algen, manchen Eubakterien und in Parasiten wie zum Beispiel Malaria-Parasiten, daher zeichnet sich diese Therapie-Strategie als sehr nebenwirkungsarm aus.

Die vorliegende Erfindung betrifft Enzyme die an diesem Stoffwechselweg beteiligt sind, sowie Teilstücke dieser Enzyme. Die vorliegende Erfindung betrifft weiter DNA-

1.5.06.11.99

Sequenzen, die für diese Enzyme kodieren, bzw. für Teilstücke dieser Enzyme.

Die Erfindung betrifft weiter die Verwendung dieser Enzyme oder ihrer Teilstücke, oder die Verwendung der DNA-Sequenzen, die für diese Enzyme kodieren, bzw. für Teilstücke dieser Enzyme zur Identifizierung von Stoffen mit Wirkung gegen ein- oder mehrzellige Erreger.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Identifizierung der Enzyme oder ihrer Teilstücke sowie die Herstellung der Enzyme oder ihrer Teilstücke über rekombinante Technologie.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der beiliegenden Zeichnungen genauer beschrieben.

Es zeigen:

Fig. 1a die Nukleotid-Sequenz des Gens, das für die Proteins 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum codiert,

Fig. 1b die Nukleotid-Sequenz des Gens, das für die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase aus Plasmodium falciparum codiert,

Fig. 2a die Nukleotid-Sequenz des Gens, für die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum codiert und die entsprechende Aminosäure-Sequenz

Fig. 2b die Nukleotid-Sequenz des Gens, für die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase aus Plasmodium falciparum codiert und die entsprechende Aminosäure-Sequenz,

Fig. 3a die Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum,

11.06.99

Fig. 3b die Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase aus dem Parasiten Plasmodium falciparum,

Fig. 4a die Darstellung der Homologien zwischen der Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase aus Plasmodium falciparum (Pfal) und bekannte Sequenzen aus unterschiedlichen Gen-Datenbanken. Die dargestellten Mikroorganismen sind *Helicobacter pylori* (H pyl), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), *Bacillus subtilis* (Bsub), *Pseudomonas aeruginosa* (Paer), *Haemophilus influenzae* (Hinf), *Escherichia coli* (Ecol), *Aquifex aeolicus* (Aeo) *Synechocystis* sp. (Syn),

Fig. 4b die Darstellung der Homologien zwischen der Aminosäure-Sequenz des Proteins 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase aus Plasmodium falciparum (Pfal) und bekannte Sequenzen aus unterschiedlichen Gen-Datenbanken. Die dargestellten Mikroorganismen sind *Helicobacter pylori* (H pyl), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), *Bacillus subtilis* (Bsub), *Pseudomonas aeruginosa* (Paer), *Haemophilus influenzae* (Hinf), *Escherichia coli* (Ecol), *Synechocystis* sp. (Syn), *Mentha piperita* (Mpip), *Oryza sativa* (Osat), *Arabidopsis thaliana* (Atha), *R. capsulata* (Rcap)

Fig. 5 In-vivo-Daten für die Parasitämie-Werte nach 4 tägiger Therapie mit jeweils drei Dosen der Stoffe:

Formyl, das 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz entspricht, und Acetyl, das 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz entspricht,

Fig. 6a die Inhibition des Wachstums von *P. falciparum* nach Zugabe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (offene Kreise) und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (geschlossene Kreise) für den Stamm HB3,

Fig. 6b die Inhibition des Wachstums von *P. falciparum* nach Zugabe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (offene Kreise) und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (geschlossene Kreise) für den Stamm A2, und Fig. 6a die Inhibition des Wachstums von *P. falciparum* nach ~~Zugabe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-~~ phosphonsäure-mononatriumsalz (offene Kreise) und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz (geschlossene Kreise) für den Stamm Dd2, und

Fig. 7 den klassischen Acetat/-Mevalonat-Pathway im Vergleich zum alternativen DOX-P-Pathway.

Mittels genetischer Verfahren konnten wir die kodierenden Gene der Enzyme DOXP-Synthase, und DOXP-Reduktoisomerase nachweisen (Figuren 1a, 1b, 2a, 2b). Nach Anreicherung durch die Polymerase-Ketten-Reaktion aus dem Genom von *P. falciparum* wurden diese Gene in bakteriellen Plasmiden kloniert und ihre Nukleotidsequenz bestimmt. Die Sequenzdaten zeigten eine hohe Homologie dieser Gene mit den entsprechenden Genen aus Algen, Pflanzen und Bakterien (Figuren 4a und 4b). Die sehr hohen Homologien zeigten eindeutig, daß die drei Gene die Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase von *P. falciparum* codieren.

Nach Expression in heterologen Systemen konnten wir die Enzyme als rekombinante Proteine reinigen und für Aktivitätsstudien in zellfreien Systemen einsetzen. Die Aktivität der DOXP-Synthase wurde durch Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat gemessen. Die Aktivität der DOXP-Reduktoisomerase wurde durch Umsetzung von 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-

D-erythritol-4-phosphat in Gegenwart von NADPH gemessen. Die Messung der Veränderung der NADPH-Konzentration ist Parameter. Dieses Verfahren ist dem Fachmann bekannt.

Die Enzyme können über ihre DNA-Sequenz ( Figuren 1a, 1b, 2a, 2b) und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz (Figuren 3a und 3b) definiert werden. Die Enzyme der einzelnen Parasiten, können sich von Parasiten zu Parasiten unterscheiden. Solche Variationen der Aminosäuren sind in der Regel Aminosäureaustausche. Es kann sich aber auch um Deletionen, Insertionen und Additionen von Aminosäuren zur Gesamtsequenz handeln. Die erfindungsgemäßen Enzyme können sowohl im Umfang und Art abhängig von der Zelle und Zelltyp, in dem sie exprimiert werden - glycosyliert oder nicht glycosyliert sein.

Die erfindungsgemäßen Enzyme oder Teilstücke dieser Enzyme werden durch Expression der erfindungsgemäßen DNA in geeigneten Expressionssystemen, beispielsweise in Bakterien, insbesondere in *E. coli*, als prokaryontisches Expressionssystem oder in einem eukaryontischen Expressionssystem, insbesondere COS-Zellen oder *Dictyostelium discoideum*, hergestellt.

Mit Hilfe der durch die Erfindung bereitgestellte Nukleinsäuresequenz ist es möglich, im Genom von beliebigen Parasiten die kodierenden Genen oder deren Varianten zu suchen, diese zu identifizieren und die gewünschten kodierenden Gene für die Enzyme zu isolieren. Derartige Verfahren und die hierfür geeigneten Screening-Methoden sind dem Fachmann bekannt.

Durch die Anwendung der rekombinanten Technologie ist es möglich, eine Vielzahl von Varianten von Enzymen oder Teilstücken von Enzymen herzustellen. Derartige Derivate können beispielsweise in einzelnen oder mehreren Aminosäuren durch Substitution, Deletion oder Addition modifiziert sein. Die Derivatisierung kann beispielsweise über site directed ~~mutagenesis (ortsspezifische Mutagenese)~~ erfolgen. Derartige Variationen sind für einen Fachmann ohne weiteres durchführbar. Es muß lediglich sichergestellt sein, daß die charakteristischen Eigenschaften der Enzyme erhalten bleiben. Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind deshalb die Enzyme, die am DOXP-Stoffwechselweg beteiligt sind, insbesondere DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase, die

- a) das Produkt einer prokaryontischen oder eukaryontischen Expression einer exogenen DNA ist,
- b) codiert werden von einer Sequenz in Figuren 1a, 1b, 2a und 2b
- c) codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in Figuren 1a, 1b, 2a und 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein kodiert, hybridisieren, oder
- d) codiert wird von DNA-Sequenzen, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit den in b) bis c) definierten Sequenzen hybridisieren würden und für ein Polypeptid mit Aminosäuresequenz kodieren.

Bevorzugt sind Enzyme, welche von den Nukleotiden aus Figuren 1a, 1b, 2a und 2b oder von DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für ein Polypeptid mit derselben Aminosäuresequenz codieren würden, codiert werden.

10.06.11-99

Die beiden erfindungsgemäßen Enzyme (Sequenz in Figuren 3a und 3b) können als neue Prototypen von spezifischen Proteinen ein- und mehrzelliger Parasiten, insbesondere der einzelligen Parasiten angesehen werden.

Gegenstand dieser Erfindung sind Nukleinsäuren, welche für die Enzyme kodieren und ausgewählt sind aus der Gruppe

- a) der in den Figuren 1a, 1b, 2a, und 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder den komplementären Sequenzen,
- b) Nukleinsäuren-Sequenzen, die mit einer der Sequenzen von
  - a) hybridisieren,
  - c) Nukleinsäuren-Sequenzen, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit einer der in a) oder b) genannten Sequenzen hybridisieren würden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Enzyme aus anderen Parasiten, welche im wesentlichen Pyruvat und Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat kondensieren (DOXP-Synthase) und 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat umsetzen (DOXP-Reduktoisomerase). Diese den Malaria-Enzymen analogen Enzyme können dadurch erhalten werden, daß mit einer Hybridisierungsprobe, die für Malaria-Enzyme codierende Sequenzen enthält, eine cDNA-Bibliothek oder genomische Bibliothek des entsprechenden Parasiten nach dem Fachmann geläufigen Methoden gescreent wird oder über den Sequenzvergleich der DNA und Proteinsequenz für Malaria-Enzyme mit anderen Parasiten-Enzymen.

Mit Hilfe der Nukleinsäuren können erfindungsgemäße Enzyme in reproduzierbarer Weise in großen Mengen gewonnen werden. Zur Expression in prokaryontischen und eukaryontischen Or-

ganismen wird die Nukleinsäure nach dem Fachmann geläufigen Verfahren in geeignete Expressionsvektoren integriert. Vorzugsweise enthält ein solcher Expressionsvektor einen regulierbaren/induzierbaren Promotor. Zur Expression werden diese rekombinanten Vektoren dann nach bekannten Verfahren in geeignete Wirtszellen eingeführt und die transformierten, transfizierten bzw. transduzierten Wirtszellen unter Bedingungen kultiviert, die eine Expression des heterologen Gens ermöglichen. Als Wirtszellen eignen sich prokaryontische Zellen, wie z.B. *E. coli*, und eukaryontische Zellen, insbesondere Hefen (z.B. *Saccharomyces cervisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*), Insektenzellen (z.B. Zelllinien von *Drosophila melanogaster* wie S2-Zellen, *Sophoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*), Wirbeltierzelllinien, vor allem Teratokarzinoma-Zelllinien wie CHO- oder COS-Zellen, und pflanzliche Zelllinien.

Die erfindungsgemäßen Enzyme können auch in transgenen Pflanzen und Tieren (z.B. Mäuse, Schafe, Ziegen, Schweine, Meerschweinchen) exprimiert werden. Das Expressionssystem ist dabei vorteilhafterweise durch dem Fachmann bekannte Techniken so zu gestalten, daß die produzierten Enzyme mit der Milch der Tiere ausgeschieden werden bzw. aus leicht zu gewinnenden Pflanzenteilen (Früchten, Blättern, Blüten, Sproß- und Wurzelteilen) erhalten werden können.

Als Expressionsvektoren eigne sich für Wirbeltierzelllinien besonders Systeme, die von Papillomaviren (z.B. SV40), Retroviren, Sindbisviren, Cytomegaloviren und Vaccinia-viren abgeleitet sind. Für Insektenzellen eignet sich besonders das Baculovirus-System, für Pflanzenzellen Systeme auf der Basis des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* und der Beschuß der Zellen mit Nukleinsäure-überzogenen Partikeln.

Von besonderer Bedeutung ist die Expression der erfindungsgemäßen Enzyme in Schleimpilzen wie *Dictyostelium discoideum*, *Polysphondylium pallidum* und *Physarum polycephalum*, da ihre Zellen kostengünstig in großen Mengen auf einfachen Medien kultiviert werden können. Die Verwendung von *Dictyostelium discoideum* bietet den weiteren Vorteil, daß dieser Organismus ähnliche Codone für die jeweiligen Aminosäuren benutzt wie *Plasmodium falciparum* und dadurch eine besonders effektive Produktion der erfindungsgemäßen Enzyme erreicht wird. Außerdem sind induzierbare Promotoren (z.B. durch Nahrungsmangel) für Expressionsvektoren für *Dictyostelium discoideum* bekannt. Dadurch kann die Ausbeute an rekombinantem Enzym weiter gesteigert werden.

Für die Expression der erfindungsgemäßen Enzyme eignen sich besonders solche Wirtszellen und Organismen, die keine intrinsischen Enzyme besitzen, die Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat kondensieren (DOXP-Synthase) und 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat umsetzen (DOXP-Reduktioisomerase). Dies trifft für Archaebakterien, Tiere, Pilze, Schleimpilze und einige Eubakterien zu. Durch das Fehlen dieser intrinsischen Enzymaktivitäten wird die Detektion und Aufreinigung der rekombinanten Enzyme wesentlich erleichtert. Auch wird es erst dadurch möglich, mit geringem Aufwand die Aktivität und insbesondere die Hemmung der Aktivität der erfindungsgemäßen rekombinanten Enzyme durch verschiedenen Chemikalien und Pharmaka in Rohextrakten aus den Wirtszellen zu messen.

Die Expression der erfindungsgemäßen Enzyme erfolgt vorteilhafterweise dann in eukaryontischen Zellen, wenn post-

translatorische Modifikationen und eine native Faltung der Polypeptidkette erreicht werden soll. Außerdem wird in Abhängigkeit vom Expressionssystem bei der Expression genomicscher DNA-Sequenzen erreicht, daß Introns durch Spleißen der DNA beseitigt und die Enzyme in der für die Parasiten charakteristischen Polypeptidsequenz produziert werden. Für ~~Introns codierende Sequenzen können auch durch rekombinante DNA-Technologie aus den zu exprimierenden DNS-Sequenzen beseitigt oder experimentell eingefügt werden.~~

Die Isolierung des Proteins kann aus der Wirtszelle oder dem Kulturüberstand der Wirtszelle nach dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen. Es kann auch eine *in vitro* Reaktivierung der Enzyme erforderlich sein.

Zur Erleichterung der Aufreinigung können die erfindungsgemäßen Enzyme oder Teilsequenzen der Enzyme als Fusionsprotein mit verschiedenen Peptidketten exprimiert werden. Dazu eignen sich besonders Oligo-Histidin-Sequenzen und Sequenzen, die von der Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin oder Calmodulin-bindenden Peptiden abgeleitet sind. Fusionen mit Thioredoxin-abgeleiteten Sequenzen eignen sich besonders für prokaryontische Expression, da dadurch die Löslichkeit der rekombinanten Enzyme erhöht wird.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Enzyme oder Teilsequenzen der Enzyme als Fusionsprotein mit solchen, dem Fachmann bekannten, Peptidketten exprimiert werden, daß die rekombinanten Enzyme in das extrazelluläre Milieu oder in bestimmte Kompartimente der Wirtszellen transportiert werden. Dadurch kann sowohl die Aufreinigung, als auch die Untersuchung der biologischen Aktivität der Enzyme erleichtert werden.

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Enzyme kann es sich als zweckmäßig erweisen, einzelne Codone zu verändern. Dabei ist der gezielte Austausch von Basen in der kodierenden Region auch sinnvoll, wenn die genutzten Codone in den Parasiten abweichend sind von der Codonnutzung im heterologen Expressionssystem, um eine optimale Synthese des Proteins zu gewährleisten. Zudem sind oft Deletionen von nicht-translatierten 5' bzw. 3'-Abschnitten sinnvoll, beispielsweise wenn mehrere destabilisierende Sequenzmotive ATTAA im 3'-Bereich der DNA vorliegen. Dann sollten diese bei der bevorzugten Expression in Eukaryonten deletiert werden. Veränderungen dieser Art sind Deletionen, Additionen oder Austausch von Basen und ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Enzyme unter standardisierten Bedingungen durch dem Fachmann bekannte Techniken durch in vitro-Translation gewonnen werden. Dafür geeignete Systeme sind Kaninchen-Reticulozyten- und Weizenkeim- Extrakte. Auch kann in vitro transskribierte mRNA in Xenopus-Oocyten translatiert werden.

Durch chemische Synthese können Oligo- und Polypeptide hergestellt werden, der Sequenzen aus der Peptidsequenz der erfindungsgemäßen Enzyme abgeleitet sind. Bei geeigneter Wahl der Sequenzen besitzen derartige Peptide Eigenschaften, die für die vollständigen erfindungsgemäßen Enzyme charakteristisch sind. Derartige Peptide können in großen Mengen hergestellt werden und eignen sich besonders für Studien über die Kinetik der Enzymaktivität, die Regulation der Enzymaktivität, die dreidimensionale Struktur der Enzyme, die Hemmung der Enzymaktivität durch verschiedene Che-

mikalien und Pharmaka und die Bindungsgeometrie und Bindungsaffinität verschiedener Liganden.

Vorzugsweise wird zur rekombinanten Herstellung der erfundungsgemäßen Enzyme eine DNA mit den Nukleotiden aus den in den Figuren 1a, 1b, 2a und 2b dargestellten Sequenzen verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Gewinnung der Enzyme, die beteiligt sind am DOXP-Stoffwechselweg, insbesondere die Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase durch Isolierung aus den Parasiten. Die Isolierung der Enzyme erfolgt aus Parasiten-Extrakten über chromatographisch, elektrophoretische und andere dem Fachmann bekannte Verfahren. Die Enzyme werden mittels Messung der jeweiligen enzymatischen Aktivität oder Reaktivität mit entsprechenden Antikörpern ermittelt.

Der Nachweis von transformierten, transfizierten bzw. transduzierten Wirtszellen, welche die Enzyme rekombinant produzieren, sowie die Aufreinigung des Proteins erfolgen vorzugsweise über Antikörper, die an diese Enzyme binden. Derartige Antikörper sind mit Hilfe der erfundungsgemäßen Enzyme oder Teile der Enzyme als Antigen oder Immunogen in einfacher Weise nach bekannten Verfahren erhältlich.

Mit den erfundungsgemäßen Antikörper gegen die Proteine können beispielsweise durch Western-Blotting-Analysen homologe bzw. kreuzreagierende Proteine anderer Parasiten detektiert werden.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind Methoden zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DOXP-Enzyme, ins-

besondere der Enzyme DOXP-Synthase und DOXP-Reduktoisomerase. Dies kann nach den bekannten Anleitungen bestimmt werden (Sprenger et al. PNAS, 94 (1997) 12857-62 und Kuzuyama et al. Tetrahedron Letters 39 (1998) 4509-12). Hierbei wird die Kondensation von Pyruvat und Glyceraldehyd-3-phosphat zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP-Synthase) und die Umwandlung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (DOXP-Reduktoisomerase) detektiert. Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist die Verwendung dieser Meßverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die die Aktivität der jeweiligen Enzyme inhibieren.

Durch die Anwendung der rekombinanten Technologie ist es möglich, eine Vielzahl von Varianten von Enzymen oder Teilstücken von Enzymen herzustellen. Derartige Derivate können beispielsweise modifiziert sein in einzelnen oder mehreren Aminosäuren durch Substitution, Deletion oder Addition. Die Derivatisierung kann beispielsweise über site directed mutagenesis (ortsspezifische Mutagenese) erfolgen. Derartige Variationen sind für einen Fachmann ohne weiteres durchführbar. Es muß lediglich sichergestellt sein, daß die charakteristischen Eigenschaften der Enzyme erhalten bleiben.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Enzyme und ihrer Homologen können neue spezifische Wirkstoffe gegen Parasiten gefunden werden.

Insbesondere können die oben beschriebenen Detektions-Methoden in geeigneten Testkits zum Screening auf antiparasitäre Wirkung von Stoffen verwendet werden. Hierzu gehören Methoden, die dem Fachmann bekannt sind und sich zum Screening von Naturstoffen aus Flora und Fauna, aus Pflanzen,

100.11.99

Algen, Bakterien oder Tieren eignen, und deren Derivate, chemischen Libraries, auch Libraries, die mittels dem Fachmann bekannten Techniken, einschließlich der kombinatorischen Chemie erstellt wurden (Pindur et al. Pharmazie in unserer Zeit 26 (1997) 24-30; Broach et al. Nature 384 (1997) 14-6; Lack et al. Chimia 50 (1996) 445-7; Czarnik und Ellmann Accounts of chemical research 29 (1996); Chemical and engineerings News 74 (1996) 28-73; Lorin et al. Chemical reviews 96 (1996) 555-600; Weber et al. Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium 42 (1994) 698-702).

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von Proteinen oder Teilstücke dieser Proteine, hierzu gehören Proteine oder Teilstücke von Proteinen mit oder auch ohne enzymatischer Aktivität in dem Fachmann bekannten Techniken zur Ermittlung von Strukturen des Proteins, insbesondere die Charakterisierung der Bindungsstellen, die sich zum Entwerfen von Liganden eignen, die sich für die Entwicklung von Mittel mit inhibierender Wirkung auf die enzymatische Aktivität eignen. Übersichtsarbeiten sind dem Fachmann bekannt ( Böhm et al. Wirkstoffdesign, der weg zum Arzneimittel von Böhm Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996; Cohen, Guidebook on molecular modelling in drug design, Academic Press, London 1996; Höltjes und Folkers, Molecular modelling, basic principles and applications, in methods and principles in medicinal Chemistry, Band 5, VCH, Weinheim 1996; Krosgaard et al. A textbook of drug design and development, 2. Auflage, Haarwood academic publishers, Amsterdam 1996)

Wirkstoffe die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine aufgefunden werden, sind für die Medizin und der Tiermedizin von hohem Interesse.

Die Wirkstoffe, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen Proteine gefunden werden, eignen sich bei günstiger Warmblütertoxizität zur Bekämpfung von pathogenen Parasiten, die bei Menschen und in der Tierhaltung und Tierzucht bei Nutz-, Zucht-, Zoo-, Labor-, Versuchs- und Hobbytieren vorkommen. Sie sind dabei gegen alle oder einzelne Entwicklungsstadien der Schädlinge, sowie gegen resistente und normal sensible Parasiten wirksam. Durch die Bekämpfung der Parasiten sollen Krankheiten, Todesfälle und Leistungsminderungen (z.B. bei der Produktion von Fleisch, Milch, Wolle, Häuten, Eiern usw.) vermindert werden, so daß der Einsatz der Wirkstoffe eine wirtschaftlichere und einfachere Tierhaltung möglich ist.

Unter Verwendung dieser erfindungsgemäßen Verfahren einschließlich der etablierten Assays (Ansätze) konnten wir zeigen, daß die Aktivität der DOXP-Reduktoisomerase durch 3-(N-acetyl-N-hydroxyamino)propylphosphonat und derivative 3-(N-formyl-N-hydroxyamino)propylphosphonat (fosmidomycin) gehemmt wird. Beide Substanzen stammen aus einer chemischen Library von Acylhydroxylaminoalkylphosphonsäurederivaten. Diese Verbindungsgruppe wurde in der Vergangenheit beschrieben als Herbizide und als bakterizid (US 4693742, DE2733658). Hier zeigte sich die Effizienz des Systems für das Auffinden von antiparasitären Wirkstoffen. Die Ergebnisse aus den Enzymassays konnten auch in der Malaria-Kultur (Siehe Beispiele) und im Tierversuch (Siehe Beispiele) bestätigt werden. Die mittels dieser Enzymassays ermittelten Inhibitoren konnten das Wachstum von Malaria-Parasiten in

vitro und in vivo hemmen. Eine Behandlung der Tiere über einem Zeitraum von 8 Tagen zeigte eine Heilung der Tiere. Hier zeigte die Acetylform eine dreifach höhere Wirksamkeit als die Formylform. Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, da wesentlich höhere (bis zu 1000x) Konzentrationen 3-(N-acetyl-N-hydroxyamino)propylphosphonat benötigt werden, um das Bakterienwachstum zu hemmen.

Damit eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäßen Mittel zur therapeutischen und prophylaktischen Behandlung von Infektionen bei Mensch und Tier geeignet, die durch Parasiten, Pilze oder Viren hervorgerufen werden. Die Verbindungen sind insbesondere als Malaria prophylaxe und als Prophylaxe der Schlafkrankheit sowie der Chagas-Krankheit, der Toxoplasmose, der Amöbenruhr, der Leishmaniosen, der Trichomoniasis, der Pneumozystose, der Balantidiose, der Kryptosporidiose, der Sarkozystose, der Akanthamöbose, der Naeglerose, der Kokzidiose, der Giardiose und der Lamblioze geeignet.

Die erfindungsgemäßen Mittel zeigten eine Wirkung gegen ein- und mehrzellige Parasiten, insbesondere gegen einzellige Parasiten (Protozoen), insbesondere gegen Erreger der Malaria und der Schlafkrankheit sowie der Chagas-Krankheit, der Toxoplasmose, der Amöbenruhr, der Leishmaniosen, der Trichomoniasis, der Pneumozystose, der Balantidiose, der Kryptosporidiose, der Sarkozystose, der Akanthamöbose, der Naeglerose, der Kokzidiose, der Giardiose und der Lamblioze.

Die erfindungsgemäßen Verfahren und erfindungsgemäßen Mittel eignen sich besonders zur Behandlung der Malaria, der Schlafkrankheit und der Leishmaniosen.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe eignen sich auch zur Inhibitoren von Bakterien, und von Pflanzen. Damit eignen sich Substanzen, die erfindungsgemäß als Inhibitoren des DOXP-Stoffwechselweges identifiziert werden, auch zur Anwendung als Herbizide und zur Anwendung bei der Behandlung von bakteriellen Infektionen bei Mensch und Tier.

Zu den Nutz- und Zuchttieren gehören Säugetiere, wie z.B. Rinder, Pferde, Schafe, Schweine, Ziegen, Kamele, Wasserbüffel, Esel, Kaninchen, Salz- und Süßwasserfische, wie z.B. Forellen, Karpfen und Aale.

Zu den Labor- und Versuchstieren gehören Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Goldhamster, Hunde, Katzen und Schweine.

Zu den Hobbytieren gehören Hunde und Katzen.

Die Anwendung kann sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch erfolgen.

Die Anwendung der Wirkstoffe erfolgt direkt oder in Form von geeigneten, dem Fachmann bekannten Zubereitungen wie enteral, parenteral, dermal oder nasal.

Die erfindungsgemäßen Mittel können in Kombination mit allen dem Fachmann bekannten Antiinfektiva verwendet werden. Hierzu gehören Substanzen, die antibakterielle, antiparasitäre, antivirale oder fungizide Wirkungen haben. Hierzu gehören Antiinfektiva, die in der Roten Liste und in der Fachliteratur (Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie von Forth et al. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim 1998; Antibiotikatherapie von Simon und Stille, Schattauer-Verlag, Stuttgart 1993) aufgeführt sind.

Da einige Parasiten sowohl über dem Mevalonat-Stoffwechselweg, als auch über dem DOXP-Stoffwechselweg

verfügen, betrifft die Erfindung insbesondere die Kombination von Inhibitoren des DOXP-Stoffwechselweges mit Mitteln, die den Fettstoffwechselweg inhibieren, einschließlich Inhibitoren der Synthese oder der Aufnahme von Lipiden, insbesondere Inhibitoren des Mevalonat-Stoffwechselweges. Hier seien insbesondere die Inhibitoren der Ezyme HMG-COA-Synthase und Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase genannt. Zu den Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase zählen insbesondere Lovastatin und Derivate, Mevastatin und Derivate, Compactin und Derivate, Simvastatin und Derivate, Pravastatin und Derivate, Atorvastatin und Derivate, Fluavastatin und Derivate und Cerivastatin und Derivate.

#### Beispiel 1

Expressionsklonierung des für die DOXP-Reductoisomerase codierenden Gens von *P. falciparum*.

Die Klonierung des für die DOX-Reductoisomerase von *P. falciparum* codierenden Gens erfolgte durch PCR-Amplifikation der entsprechenden Sequenzen von genomischer DNA als Matrize. Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde der *P. falciparum*-Stamm HB3 nach der Kerzentopf-Methode kultiviert (Tranger und Jensen (1976), Science 193, 673-675). Als Kulturmödium wurde RPMI 1640 (mit HEPES und L-Glutamin, Gibco) mit 10 % humanem Serum, 0.3 µg / ml Gentamycin und 0.1 mM Hypoxanthin supplementiert und mit humanen Erythrozyten ein Hämatokrit von 5 % eingestellt. Für die Präparation der DNA wurden 15 Kulturschalen mit je 35 ml Kulturvolumen bei ca. 4 % Parasitämie verwendet. Die infizierten Erythrozyten wurden durch Zentrifugation geerntet und zweimal in Träger-Puffer (57 mM NaCl, 58 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11

11.06.11.99

mM NaHCO<sub>3</sub>, 14 mM Glucose) gewaschen. Die Parasiten wurden aus den Erythrozyten freigesetzt, indem das Zellsediment mit einem 10fachen Volumen 1 %iger Saponinlösung in Träger-Puffer für 5 min auf Eis lysiert wurde (modifiziert nach Kilejian (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4650-4653). Die freien Parasiten wurden zweimal durch Zentrifugation (10 min, 10.000 rpm, 4 °C) mit einer Lösung von 1 % BSA in Träger-Puffer gewaschen. Die DNA-Präparation aus den gewonnenen freien Parasiten erfolgte nach Standardprotokollen. Zunächst wurden die Parasiten mit Proteinase K verdaut. Dann wurde der Ansatz viermal mit Phenol / Chloroform extrahiert, die DNA-Lösung über Nacht gegen TE dialysiert und anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Für die PCR-Amplifikation wurden folgende Primer verwendet:

PfYAEMfor 5'-CTGAATTCATATTACAAAATTAATAGATG-3'  
PfYAEMrev 5'-GTACTATGAAGAATTATGTTGTTGTATAT-3'.

Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

3 µl 10 x PCR-Puffer  
2,4 µl 25 mM MgSO<sub>4</sub>  
2,4 µl 2,5 mM dNTP  
2 µl Matrizen-DNA (0,2 µg / ml)  
2 µl Primer 1 (7,5 µM)  
2 µl Primer 2 (7,5 µM)  
0,2 µl Taq-Polymerase (5 U / µl)  
16 µl H<sub>2</sub>O

Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Profil:

3 Zyklen: 96 °C 1 min  
48 °C 1 min

72°C 3 min

32 Zyklen: 95 °C 40 sec

48°C 1 min

72°C 3 min

Nach dem letzten Zyklus wurde der Ansatz zur vollständigen  
~~Verlängerung aller Produkte noch 10 min bei 72°C inkubiert.~~

Das PCR-Produkt von 4 derartigen Ansätzen wurde vereinigt und über ein 0.7 %iges Agarosegel gereinigt. Die Elution der DNA aus dem Agaroseblöckchen erfolgte mit dem „Kit for DNA extraction“ (Millipore, Kat. Nr. S667). Die eluierte DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und in 10 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurde das PCR-Produkt nach den Vorschriften des Herstellers mit dem TA-cloning kit (Invitrogen) kloniert. Dabei wurden 20 ng insert-DNA für einen Ligationsansatz verwendet. Bakterienkolonien, die das gewünschte rekombinante Plasmid trugen, wurden durch analytische Plasmidpräparation und EcoR I- Verdau der Plasmide identifiziert. Die klonierten PCR-Produkte wurden dann unter Verwendung von Standard- Forward- und Reverse-Primern sequenziert; die Sequenzen wurden mit der Technik des Primer Walkings vervollständigt.

Für die Expression in COS-7- Zellen wurde ein PCR-Produkt, das in der entsprechenden Orientierung im pCR2.1-Vektor vorlag, in den Expressionsvektor pBK-CMV (Stratagene) umkloniert. Die Umklonierung erfolgte dabei über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Not I und BamH I, die im Polylinker beider Vektoren vorkommen. Für die Transfektion der COS-7-Zellen wurde der Expressionsvektor mit dem PCR-Produkt als Insert über Anionenaustausch-Chromatographie (Qiagen) im präparativen Maßstab hergestellt.

Alle für die Klonierung verwendeten Methoden sind ausführlich beschrieben in J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis

14.06.11.99

(1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, USA.

Die COS-7-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS unter Standardbedingungen kultiviert. Pro Zellkulturflasche wurden 30 ml Kulturmedium berechnet. Für die Transfektion wurden ~~Zellen bei ca. 50 % Konfluenz verwendet, die am Vortag~~ frisch gesplittet worden waren. Als Transfektionsreagenz wurde DOTAP (Boehringer) verwendet. 40  $\mu$ l DNA-Lösung (0,5  $\mu$ g / ml) wurden mit 110  $\mu$ l 20 mM HEPES (pH 7,4) gemischt. Außerdem wurden 100  $\mu$ l DOTAP mit 230  $\mu$ l 20 mM HEPES (pH 7,4) in einem Polystyrol-Reaktionsgefäß gemischt. Dann wurde die DNA-Lösung zu der DOTAP-Lösung zupipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 20 ml Kulturmedium gemischt und das Medium der COS-7-Zellen durch dieses Gemisch ersetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Medium in neue Zellkulturflächen transferriert. Nach weiterer 48stündiger Inkubation wurden die transfizierten COS-7-Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen abgeschabt und dreimal durch Zentrifugation in Assay-Puffer (100 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM MnCl<sub>2</sub>) gewaschen. Die Zellen wurden in einem minimalen Volumen Assay-Puffer resuspendiert und durch dreimaliges Einfrieren (in flüssigem Stickstoff) und Auftauen aufgeschlossen. Zellfragmente wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert (13 000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand direkt für die Messung der Enzymaktivität oder zur Aufreinigung des Enzyms verwendet.

Beispiel 2

Reinigung der rekombinanten DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum*

Zur genaueren Charakterisierung wurde die in COS-7-Zellen exprimierte rekombinante DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* zur weitgehenden Homogenität aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte über einen affinitätschromatographischen und einen gelpermeationschromatographischen Schritt.

Zur Herstellung einer geeigneten Affinitätschromatographie-Säule wurden zunächst Antikörper gegen die DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* hergestellt. Dazu wurden aus der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz solche Abschnitte ausgewählt, für die eine besonders hohe antigene Wirkung vorausgesagt werden konnte. Entsprechende Peptide wurden synthetisiert und für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Qualität der erhaltenen Antiseren wurde sowohl anhand ihrer Reaktivität mit den synthetischen Peptiden, als auch durch Western blot-Analysen bestätigt. Für die Western blot-Analysen (BM Western Blotting Kit, Boehringer) wurden Extrakte aus *P. falciparum* und rekombinanten COS-Zellen verwendet.

Zur Herstellung der Affinitätschromatographie-Säule wurde das Antiserum zur Beseitigung niedermolekularer Amine gegen PBS dialysiert. Die Antikörper wurden dann an Protein A-Sepharose gebunden und durch Cross-linking mit DMP kovalent gekoppelt (IgG Orientation Kit, Pierce). Der Proteinextrakt wurde wie in Beispiel 1 beschrieben aus 55 Zellkulturflächen mit transfizierten COS-7-Zellen gewonnen und auf die mit Assay-Puffer äquilibrierte Säule geladen. Nach exzessivem Waschen mit Assay-Puffer wurde die Säule mit Elutions-Puffer (100 mM GlycinHCl (pH 2,8), 0.4 % CHAPS) eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 1 M TrisHCl (pH 7,5) neutralisiert. Die Hauptfraktionen wurden durch Western blot-Analyse

identifiziert. Dazu wurden für die Detektion biotinylierte Antikörper verwendet, um eine Störung durch von der Säule in geringer Menge eluierte Antikörper zu vermeiden. Die Hauptfraktionen wurden vereinigt, gegen Assay-Puffer dialysiert und durch Ultrafiltration (30 kDa, Amicon) konzentriert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Gelpermeationsschomatographie (Superdex 200, Pharmacia) mit Assay-Puffer als Start- und Elutions-Puffer. Die Hauptfraktionen wurden wie oben beschrieben identifiziert, vereinigt und konzentriert, mit 20 % Glygerin versetzt und bei -70°C eingefroren. Durch SDS-PAGE (12 % Acrylamid) unter reduzierenden Bedingungen und Silberfärbung (Gelcode Colour Silver Stain Kit, Pierce) wurde die gereinigte DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* als einheitliche Bande bei 54 kDa dargestellt.

### Beispiel 3

#### Bestimmung der Aktivität des gereinigten Enzyms und Screening nach Inhibitoren

Die DOXP-Reductoisomerase-Aktivität des gereinigten Enzyms wurde in einem *in vitro*-Versuchssystem bestätigt. Für einen typischen Versuchsansatz wurden 100 µl Assay-Puffer mit 0,3 mM NADPH, 0,3 mM DOXP und 10 µg rekombinantem Enzym verwendet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von DOXP zum kompletten Ansatz gestartet. Die Oxidation von NADPH wurde photometrisch bei 340 nm in Mikroquarzküvetten bei 37°C verfolgt. Dieses Versuchssystem wurde verwendet, um die Inhibition der rekombinanten DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* durch verschiedene Substanzen zu zeigen. Nach Zugabe von 1 µM 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz und 1 µM 3-(N-Acetyl-N-

11.08.11.99

hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz zum Reaktionsansatz war keine Veränderung der Absorption bei 340 nm zu beobachten. Unter diesen Bedingungen wurde die DOXP-Reductoisomerase von *P. falciparum* vollständig inhibiert.

#### Beispiel 4

##### Test der Wirksamkeit der Substanzen gegen Malaria *in vivo*

Die verschiedenen Derivate wurden nach dem modifizierten Peters' Test getestet. Die Substanzen wurden dabei in einem Viertel der halblethalen Dosis (LD50) appliziert. Bei dem Versuchsansatz wurden zehn Mäuse mit *Plasmodium vinckeii*, dem Erreger der Mäusemalaria, infiziert. Nach Bestätigung der Infektion durch Blutuntersuchung erfolgte die Behandlung in vier Mäusen. Als Kontrolle dienten sechs Mäuse, die nicht behandelt wurden. Die Behandlung mit 1-1000 mg/kg/d , 3-(N-Formyl-N-Hydroxylamino)-propylphosphonsäuremononatriumsalz über 3 Tage führte zu einer Abtötung der Parasiten im Blut der Mäuse. Die behandelte Gruppe war bereits nach einem Tag frei von lebenden Parasiten. Die Kontrollmäuse mußten am Tag 5 nach Infektion bei einer Parasitämie von > 80% getötet werden. Die behandelten Mäuse waren auch 8 Wochen nach Behandlungsende immer noch frei von Parasiten. Weitere Experimente zeigten eine Wirksamkeit von 50 mg/kg/d 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz in Mäusen mit einer Parasitämie von 80%. Auch diese Mäuse waren nach 1 Tag frei von lebenden Parasiten. Die weiteren Ergebnisse für 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz und 3-(N-Acetyl-N-hydroxylamino)-propyl-phosphonsäure-mononatriumsalz sind in Figur 5 dargestellt.

## Beispiel 5

Schutzwirkung vor Malaria beim Versuch mit infizierten Mäusen

Die Wirksamkeit der Verbindungen in vivo gegenüber Malaria wurde unter Heranziehen von 20 bis 25 g schweren männlichen Mäusen (BALB/c-Stamm) getestet. Einen Tag vor der Infektion wurden vier Mäuse intraperitoneal mit 50 mg/kg 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäure-mononatriumsalz behandelt. Die Mäuse wurden dann mit Plasmodium vinckeii infiziert. Mäuse, die nicht mit der Substanz vorbehandelt wurden, dienten als Kontrolle. Es konnte in den behandelten Mäusen keine Infektion nachgewiesen werden, während die Kontrollmäuse nach 5 Tagen mit einer Parasitämie über 80% getötet werden. Die behandelten Mäuse waren auch 8 Wochen nach der Infektion frei von Parasiten.

## Beispiel 6

In vitro Inhibition des Wachstums von Malaria Parasiten  
Zum Prinzip der IC50-Bestimmung (die Konzentration, bei der die Vitalität der Parasiten um die Hälfte reduziert wird)

Zur Bestimmung der IC50-Werte werden die Malaria-Parasiten zunächst für einen vollständigen 48-Stunden-Zyklus in Gegenwart von Inhibitoren kultiviert, in den anschließenden 24 Stunden wurde die Überlebensrate durch  $[^3\text{H}]$ -Hypoxanthin-Einbau gemessen. Auf einer Mikrotiterplatte wird eine Verdünnungsreihe von 3-(N-Formyl-N-hydroxylamino)-propylphosphonsäuremononatriumsalz in 10-fach konzentrierten 20- $\mu\text{l}$ -Aliquots vorgelegt. Dann werden zu jedem Well 180  $\mu\text{l}$  Parasitensuspension in Kulturmedium zugefügt. Es werden

asynchrone Kulturen mit ca. 0,4% Parasitämie und 2 % Hämatokrit verwendet. Anschließend werden die Mikrotiterplatten für 48 h inkubiert. Dann werden zu jedem Well 30  $\mu$ l [ $^3$ H]-Hypoxanthin zugefügt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und die inkorporierte Radioaktivität wurde gemessen. In den Figuren 6a, 6b und 6c sind die Ergebnisse mit den Stämmen HB3, A2 und Dd2 mit bekannten Resistenzen gegen andere Malaria-Medikamente dargestellt. In beiden Stämmen ergibt sich ein IC-50-Wert von unter 0,5  $\mu$ M. Die Resistenzen dieser Stämme sind:

*Plasmodium falciparum* HB3 (Honduras) ist gegen Pyrimethamin resistent.

*Plasmodium falciparum* Dd2 (Indochina) ist gegen Cloroquin, Chinin, Pyrimethamin, Cycloguanil und Sulfadoxin resistent.

*Plasmodium falciparum* A2 (Gambia) ist gegen Chloroquin und Cycloguanil resistent.

Es wurden keine Kreuzresistenzen mit Anti-Malaria-Mitteln gefunden.

Patentansprüche

1. Mittel zur Vorbeugung und Behandlung von Infektionskrankheiten, verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten, gekennzeichnet dadurch, daß es eine die Enzyme oder Co-faktoren des 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweges hemmende Substanz enthält.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von Glycerialdehyd und Pyruvat zu 1-Deoxy-D-Xylulose hemmt.
3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von Glycerinldehyd-3-phosphat und Pyruvat zu Isopentenyl-diphosphat hemmt.
4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Bildung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat hemmt.
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von Glycerinldehyd-3-Phosphat und Pyruvat zu 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat hemmt.
6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat hemmt.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Bildung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat hemmt.

8. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat hemmt.
9. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat hemmt.

---

10. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Umsetzung von 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat zu Isopentenyldiphosphat hemmt.
11. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es die Produktion der beteiligten Enzyme oder der beteiligten Co-Faktoren hemmt.
12. Mittel nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es den Abbau der beteiligten Enzyme oder beteiligten Co-Faktoren fördert.
13. Mittel nach den Ansprüchen 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß es den Umsatz des Enzyms 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase oder 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktase hemmt.
14. Verwendung von Mitteln nach einem der vorhergehenden Ansprüchen zur Behandlung von Infektionskrankheiten, verursacht durch ein- oder mehrzellige Parasiten bei Mensch und Tier.
15. Pharmazeutischen Mittel nach einem der Ansprüche 1-13, das einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweist.

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel mindestens einen weiteren wirksamen pharmazeutischen Wirkstoff aufweist.
17. Arzneimittel, nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel ein Hemmer der ~~Fettstoffwechselwege und der Cholesterinsynthese und der Cholesterinaufnahme~~ ist.
18. Arzneimittel nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel ein HMG-CoA-Reduktase-Hemmer oder ein HMG-CoA-Synthase-Hemmer ist.
19. Arzneimittel nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das pharmazeutische Mittel ein oder mehrere Bestandteile der Gruppe aufweist, die besteht aus Lovastatin, Mevastatin, Compactin, Simvastatin, Pravastatin, Atorvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin.
20. Verwendung von Arzneimitteln nach den Ansprüchen 1-19 für die Behandlung von Infektionen verursacht durch Bakterien.
21. Verwendung von Mitteln nach den Ansprüchen 1-19 als Herbizide.
22. Protein mit oder ohne 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase Aktivität, welches am 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Stoffwechselweges beteiligt ist und a) codiert wird von der in Sequenz 1b und 2b gezeigten DNA-Sequenz b) codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in Sequenz 1b oder 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten

dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein codiert, hybridisieren.

23. Protein mit oder ohne 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase Aktivität, welches am 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweges beteiligt ist und

---

a) codiert wird von der in Sequenz 1a und 2a gezeigten DNA-Sequenz, b) codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in Sequenz 1a oder 2a gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein codiert hybridisieren.

24. Proteine nach den Ansprüchen 22 oder 23 und weitere Proteine, die am 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweges beteiligt sind und erhältlich sind aus den Kulturüberständen von Parasiten oder aus den aufgeschlossenen Parasiten und Aufreinigung über chromatographische und elektrophoretische Techniken.

25. Proteine nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es a) das Produkt einer prokaryontischen oder eukaryontischen Expression einer exogenen DNA sind, b) codiert werden von den Sequenzen 1a, 1b, 2a oder 2b oder codiert wird von DNA-Sequenzen, die mit den in den Sequenzen 1a, 1b, 2a oder 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder Fragmenten dieser DNA-Sequenzen im DNA-Bereich, der für das reife Protein kodiert, hybridisieren, oder c) codiert werden von DNA-Sequenzen, die ohne Degeneration des genetischen Codes mit den in b) definierten Sequenzen hybridisieren würden und für ein Polypeptid mit entsprechender Aminosäure-Sequenz kodieren.

34 08.11.99

26. Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen, welches aus den Aminosäuren von Sequenz 2a, 2b, 3a, 3b besteht.

27. Nukleinsäure welche für ein Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüche kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt ist aus der Gruppe a) der in Sequenz 1a, 1b, 2a, 2b gezeigten DNA-Sequenzen oder der komplementären DNA-Sequenzen, b) Nukleinsäure-Sequenzen, die mit der Sequenz von a) hybridisieren, c) Nukleinsäure-Sequenzen, die ohne die Degeneration des genetischen Codes mit einer der in a) oder b) genannten Sequenzen hybridisieren würden.

28. DNA mit der in Sequenz 1a gezeigten Sequenz.

29. DNA mit der in Sequenz 1b gezeigten Sequenz.

30. DNA mit der in Sequenz 2a gezeigten Sequenz.

31. DNA mit der in Sequenz 2b gezeigten Sequenz.

32. Rekombinanter Expressionsvektor, der DNA enthält, die für ein Protein nach den Ansprüchen 22 bis 26 codiert und in einem transformierten Mikroorganismus oder einem transformierten eukaryontischen Zelle, oder in einem Tier oder eine Pflanze die proteincodierende DNA exprimiert.

33. Prokaryontische Wirtszelle, eukaryontische Wirtszelle Tiere und Pflanzen, welche mit einer DNA, die für ein Protein nach den Ansprüchen 22 bis 26 kodiert, transfiziert ist und das genannte Protein produzieren kann.

34. Wirtszelle nach Anspruch 33, die *E. coli* oder eine Säugerzelllinie ist.

35. Verwendung von DNA, die für ein Protein nach den Ansprüchen 22 bis 26 kodiert, zur Transfektion eines prokaryontischen oder eukaryontischen Organismus.

---

36. Verfahren zur Gewinnung eines Proteins, das am 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg beteiligt ist aus Parasiten oder aus Kulturüberständen von Parasiten-Kulturen über chromatographische und elektrophoretische Techniken.

37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei das Protein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase oder 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase ist.

38. Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Proteins, daß am 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg beteiligt ist durch Expression der DNA aus einem der vorangehenden Ansprüchen in einer geeigneten Wirtszelle und Isolierung des Proteins aus der Wirtszelle oder aus dem Kulturüberstand der Wirtszelle.

39. Verwendung eines Proteins aus dem 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen als Antigen oder Immunogen zur Herstellung von Antikörpern, die an dieses Protein binden.

40. Antikörper gegen ein Protein aus dem 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Stoffwechselweg gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen, erhältlich durch in-vitro-

36.11.06.11.99

Immunisierungstechniken oder durch Immunisierung eines Tieres mit einem Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen und Gewinnung der Antikörper aus dem Serum oder aus den Milzzellen der immunisierten Tiere.

41. Verwendung eines Proteins gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung von anti-parasitär wirkenden Stoffen.
42. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung eines antiparasitär wirkenden Stoffes.
43. Testsysteme unter Verwendung eines Proteins gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung eines antiparasitär wirkenden Stoffes.
44. Testsysteme unter Verwendung eines Proteins gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen zur Identifizierung eines antiparasitär wirkenden Stoffes.
45. Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, welche ein Protein gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen codieren, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Probe mit einer Nukleinsäuresonde inkubiert wird, welche aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus a) der in den Figuren 1a und 1b gezeigten DNA-Sequenzen oder der dazu komplementären Sequenz, b) Nukleinsäuren, die mit einer der Sequenzen von a) hybridisieren bestehen, die Nukleinsäuresonde mit der Nukleinsäure der Probe inkubiert wird und die Hybridisierung ggf. über einen weiteren Bindepartner von Nukleinsäuresonde nachgewiesen wird.

37. 06. 11. 99

46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß die nachzuweisende Nukleinsäure vor dem Nachweis amplifiziert wird.
47. Herstellung und Verwendung von 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase oder 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Reduktoisomerase gemäß einem der vorangehenden Ansprüchen.
48. Verwendung nach Anspruch 14 zur Behandlung von Malaria, der Schlafkrankheit und der Leishmaniosen.

10 30 50 50  
ATGAAGAAATATTTATATTTTCTTCATCAATAACTATTAATGATTAGTA

70 90 110  
ATAAAATAATACATCAAAATGTGTTCCATTGAAAGAAGAAAAATAACGCATATATAAAT

130 150 170  
TATGGTATAGGATATAATGGACCAGATAATAAAATAACAAAGAGTAGAAGATGTAAGA

190 210 230  
ATAAAGTTATGCAAAAAGGATTTAATAGATATTGGTCAATAAGAAACCAATTAATGTA

250 270 290  
GCAATTTGGAAAGTACTGGTAGTATAGGTACGAATGCTTAAATATAATAAGGGAGTGT

310 330 350  
AATAAAATTGAAAATGTTTAATGTTAAAGCATTGTATGTGAATAAGAGTGTGAATGAA

370 390 410  
TTATATGAAACAGCTAGAGAATTTTACCAAGAATATTGTATACATGATAAAAGTGT

430 450 470  
TATGAAGAATTAAAAGAGTTGGTAAAAAATATAAAAGATTATAAACCTATAATATTGTGT

490 510 530  
GGTGAGAAGGGAAAAGAAATATGTAGTAGTAATAGTATAGATAAAATAGTTATTGGTATT

550 570 590  
GATTCTTCAAGGATTATATTCTACTATGTATGCAATTATGAATAATAAAATAGTTGCG

610 630 650  
TTAGCTAATAGAATCCATTGTCTGCTGGTTCTTTAAAGAAATTATTAATATT

670 690 710  
CATAAAAATGCAAAGATAATACCTGTTGATTAGAACATAGTGCTATATTCAATGTTA

730 750 770  
GATAATAATAAGGTATTAACACAAATGTTACAAGACAATTCTAAATTAAACAAT

790 810 830  
ATAAAATAATTTATGTCATCTGGAGGTCCATTCAAAATTAACTATGGACGAA

850 870 890  
TTAAAAAAATGTAACATCAGAAAATGCTTAAAGCATCCTAAATGGAAAATGGTAAGAAA

910 930 950  
ATAACTATAGATTCTGCAACTATGATGAATAAAGTTAGAGGTTAGAAACCCATTAA

970 990 1010  
TTATTTGATGTAGATTATAATGATATAGAAGTTAGTACATAAGAATGCAATTACAT

1030 1050 1070  
TCTTGTGTTGAATTATAGACAAATCAGTAATAAGTCATGTATTATCCAGATATGCAA

1090 1110 1130  
ATACCCATATTATATTCTTAACATGGCCTGATAGAAATAAAACAAATTAAACCTTTA

1150 1170 1190  
GATTGGCTCAGGTTCACTCTTACATTCAAAACCTTCTTAGAACATTCCCGTGT

1210 1230 1250  
ATTAAATTAGCTTATCAAGCAGGTATAAAAGGAAACTTTATCCAATGACTAAATGCG

1106-11-99

1270 1290 1310  
TCAAATGAAAATAGCTAACAACTTATTTGAATAATAAAAATTAAATATTTGATATTCC  
1330 1350 1370  
TCTATAATATCGCAAGTTCTGAATCTTCATTCTCAAAAGGTTCGGAAAATAGTGAA  
1390 1410 1430  
GATTTAATGAAGCAAATTCTACAAATACATTCCCTGGGCCAAAGATAAAGCTACCGATATA  
1450  
TACAACAAACATAATTCTTCA

---

Fig. 1a Teil 2

1 GATGAAATAT ATAAAGAAAT ATATGAACTA TATGTAGAAA GAAATATTCC  
51 TGAATATTAT GAACGAAAAT ATTTTCAGA AGATATTAAA AAGAGTGTCC  
101 TATTTGATAT AGATAAATAT AATGATGTG AATTTGAAAA AGCTATAAAA  
151 GAAGAATTAA TAAATAATGG AGTTTATATT AATAATATAG ATAATACATA  
201 TTATAAAAAA GAAAATATTT TAATAATGAA AAAGATATTA CATTATTTCC  
251 CATTATTAAA ATTAATTAAT AATCCATCAG ATTTAAAAAA GTTAAAAAAA  
301 CAATATTTAC CTTTATTAGC ACATGAATTAA AAAATATTTT TATTTTTAT  
351 TGTAATATA ACAGGAGGTC ATTTTCCTC TGTTTAAGC TCTTAGAAA  
401 TTCAATTATT ATTATTGTAT ATTTTAATC AACCATATGA TAATGTTATA  
451 TATGATATAG GACATCAAGC ATATGTACAT AAGATATTGA CCGGAAGAAA  
501 ACTATTATTT CTATCATTAA GAAATAAAAA AGGTATTAGT GGATTCCCTAA  
551 ATATTTTGAAAGTATTAT GATAAATTG GGGCTGGTCA CAGTTCCACT  
601 TCATTAAGTG CTATACAAGG ATATTATGAA GCCGAGTGGC AAGTGAAGAA  
651 TAAAGAAAAA TATGGAAATG GAGATATAGA AATAAGTGAT AACGCAAATG-  
701 TCACGAATAA TGAAAGGATA TTTCAAAAG GAATACACAA TGATAATAAT  
751 ATTAACAATA ATATTAATAA TAATAATTAT ATCAATCCTT CAGATGTGGT  
801 AGGAAGAGAA AATACGAATG TACCAAATGT ACGAAATGAT AACCATAACG  
851 TGGATAAAAGT ACACATTGCT ATTATAGGAG ATGGTGGTTT AACAGGTGGA  
901 ATGGCATTAG AAGCGTTAAA TTATATTCA TTCTTGAATT CTAATTTT  
951 AATTATTTAT AATGATAACG GACAAGTTTC TTTACCAACA AATGCCGTAA  
1001 GTATATCAGG TAATAGACCT ATAGGTTCTA TATCAGATCA TTTACATTAT  
1051 TTTGTTCTA ATATAGAAGC AAATGCTGGT GATAATAAT TATCGAAAAAA  
1101 TGCAAAAGAG AATAACATTT TTGAAAATTT GAATTATGAT TATATTGGTG  
1151 TTGTGAATGG TAATAATACA GAAGAGCTCT TTAAAGTATT AAATAATATA  
1201 AAAGAAAATA AATTAAAAAG AGCTACTGTT CTTCATGTAC GTACAAAAAA  
1251 ATCGAATGAT TTTATAAATT CAAAGAGTCC AATAAGTATA TTGCACTCTA  
1301 TAAAGAAAAA TGAGATTTC CCGTTCGATA CCACTATATT AAATGGAAAT  
1351 ATTCTATAAGG AGAACAAAGAT AGAAGAAGAG AAAATGTGT CTTCATCTAC  
1401 AAAGTATGAT GTAAATAATA AGAATAATAA AAATAATGAT AATAGTGAAA  
1451 TTATAAAAATA TGAAGATATG TTTCAAAAG AGACGTTCAC AGATATATAT

Fig. 1b      Teil 1

M 06.11.99

1501 ACAAAATGAAA TGTTAAAATA TTTAAAGAAA GATAGAAATA TAATATTCCCT  
1551 ATCTCCCGCT ATGTTAGGAG GATCAGGATT GGTTAAAATT AGTGAGCGTT  
1601 ATCCAAATAA TGTATATGAT GTAGGTATAG CAGAACACA TTCTGTAAC  
1651 TTCGCAGCAG CTATGGCAAT GAATAAGAAA TTAAAAATAC AATTATGTAT  
1701 ATATTGACCC TTTTACAAA GAGCATATGA TCAAATTATA CATGATCTTA  
1751 ATTTACAAAA TATACCTTA AAGGTTATAA TTGGAAGAAG TGGATTAGTA  
1801 GGAGAGGATG GGGCAACACA TCAAGGTATA TATGATTAT CTTATCTTGG  
1851 GACACTTAAC AATGCATATA TAATATCTCC AAGTAATCAA GTTGATTGAA  
1901 AAAGAGCTCT TAGTTTGCT TATTTAGATA AGGACCATTG TGTGTATATA  
1951 CGTATACCCA GAATGAACAT ATTAAGTGAT AAGTACATGA AAGGATATTT  
2001 GAACATTCCAT ATGAAAAATG AGAGCAAAAA TATCGATGTA AACGTGGATA  
2051 TAAACGATGA TGTAGATAAA TATAGTGAAG AATATATGGA CGATGATAAT  
2101 TTTATAAAAT CGTTTATTGG AAAATCTAGA ATTATTAAAA TGGATAATGA  
2151 AAATAATAAT ACAAAATGAAC ATTATTCAAG CAGAGGAGAT ACACAGACAA  
2201 AAAAAAAAAGTTTGATC TTTAACATGG GTAGTATGCT TTTTAATGTA  
2251 ATTAATGCTA TAAAAGAAAT TGAAAAAGAA CAATATATTT CACATAATTA  
2301 TTCTTTTCA ATTGTTGATA TGATATTTT AAATCCTTA GATAAAAATA  
2351 TGATA

Fig. 1b      Teil 2

1000-11-96

10 30 50  
ATGAAGAAATATTTATATATTTCTTCATCACAATAACTATTAATGATTTAGTA  
M K K Y I Y I Y F F F I I T I N D L V

70 90 110  
ATAAATAATACATCAAAATGTGTTCCATTGAAAGAAGAAAAATAACGCATATATAAAT  
I N N T S K C V S I E R R K N N A Y I N

130 150 170  
TATGGTATAGGATATAATGGACCAGATAATAAAATAACAAAGAGTAGAAGAGATGTAAAAGA  
Y G I G Y N G P D N K I T K S R R C K R

---

190 210 230  
ATAAAGTTATGCAAAAAGGATTTAATAGATATTGGTGCAATAAAGAAACCAATTAATGTA  
I K L C K K D L I D I G A I K K P I N V

250 270 290  
GCAATTTGGAAAGTACTGGTAGTATAGGTACGAATGCTTAAATATAATAAGGGAGTGT  
A I F G S T G S I G T N A L N I I R E C

310 330 350  
AATAAAATTGAAAATGTTTTAATGTTAAAGCATTGTATGTGAATAAGAGTGTGAATGAA  
N K I E N V F N V K A L Y V N K S V N E

370 390 410  
TTATATGAACAAGCTAGAGAATTTTACCAAGAATATTTGTATACATGATAAAAGTGT  
L Y E Q A R E F L P E Y L C I H D K S V

430 450 470  
TATGAAGAATTAAAAGAGTTGGTAAAAAATATAAAAGATTATAAACCTATAATATTGTGT  
Y E E L K E L V K N I K D Y K P I I L C

490 510 530  
GGTGAGAAGGGAAAAGAAATATGTTAGTAGTATAGTATAGATAAAATAGTTATTGGTATT  
G E K G K E I C S S N S I D K I V I G I

550 570 590  
GATTCTTTCAAGGATTATATTCTACTATGTATGCAATTATGAATAATAAAATAGTTGCG  
D S F Q G L Y S T M Y A I M N N K I V A

610 630 650  
TTAGCTAATAAGAATCCATTGTCTGCTGGTTCTTTAAAGAAATTATTAATATT  
L A N K E S I V S A G F F L K K L L N I

670 690 710  
CATAAAAATGCAAAGATAATAACCTGTTGATTCAAGAACATAGTGTATATTCAATGTTA  
H K N A K I I P V D S E H S A I F Q C L

730 750 770  
GATAATAATAAGGTATTAAAACAAAATGTTACAAGACAATTCTAAATTAACAAT  
D N N K V L K T K C L Q D N F S K I N N

790 810 830  
ATAAATAAAATATTTATGTCATCTGGAGGTCCATTCAAAATTAACTATGGACGAA  
I N K I F L C S S G G P F Q N L T M D E

850 870 890  
TTAAAAAAATGTAACATCAGAAAATGCTTAAAGCATCCTAAATGGAAAATGGTAAGAAA  
L K N V T S E N A L K H P K W K M G K K

Fig. 2a Teil 1

M 06.11.99

910 930 950  
ATAACTATAGATTCTGCAACTATGATGAATAAAGGTTAGAGGTTATAGAAACCCATTT  
I T I D S A F M M N K G L E V I E T H F

970 990 1010  
TTATTTGATGTAGATTATAATGATATAGAAGTTAGTACATAAAGAATGCATTATACAT  
L F D V D Y N D I E V I V H K E C I I H

1030 1050 1070  
TCTTGTGTTGAATTATAGACAAATCAGTAATAAGTCAAATGTATTATCCAGATATGCAA  
S C V E F I D K S V I S Q M Y Y P D M Q

---

1090 1110 1130  
ATACCCATATTATTCCTAACATGGCCTGATAGAATAAAACAAATTAAACCTTTA  
I P I L Y S L T W P D R I K T N L K P L

1150 1170 1190  
GATTTGGCTCAGGTTCAACTCTTACATTCATAAACCTCTTAGAACATTCGGTGT  
D L A Q V S T L T F H K P S L E H F P C

1210 1230 1250  
ATTAAATTAGCTTATCAAGCAGGTATAAAAGGAAACTTTATCCAACGTACTAAATGCG  
I K L A Y Q A G I K G N F Y P T V L N A

1270 1290 1310  
TCAAATGAAATAGCTAACAACTTATTTGAATAATAAAATTAATTTGATATTCC  
S N E I A N N L F L N N K I K Y F D I S

1330 1350 1370  
TCTATAATATCGCAAGTTCTGAATCTTCAATTCTAAAAGGTTTCGGAAAATAGTGA  
S I I S Q V I E S F N S Q K V S E N S E

1390 1410 1430  
GATTTAATGAAGCAAATTCTACAAATACATTCTGGCCAAAGATAAAGCTACCGATATA  
D L M K Q I L Q I H S W A K D K A T D I

1450  
TACAACAAACATAATTCTTCA  
Y N K H N S S

Fig. 2a      Teil 2

10 30 50  
GATGAAATA AAAGAAATATATGAACTATAATGTAGAAAGA ATTCCCTGAATATTAT  
D E I Y K E I Y E L Y V E R N I P E Y Y

70 90 110  
GAACGAAAATATTTTCAGAAGATATTAAAAGAGTGTCTATTGATATAGATAAATAT  
E R K Y F S E D I K K S V L F D I D K Y

130 150 170  
AATGATGTCGAATTTGAAAAAGCTATAAAAGAAGAATTATAAATAATGGAGTTATATT  
N D V E F E K A I K E E F I N N G V Y I

190 210 230  
AATAATATAGATAATACATATTATAAAAAGAAAATATTTAATAATGAAAAAGATATTA  
N N I D N T Y Y K K E N I L I M K K I L

---

250 270 290  
CATTATTCCTCATTATAAAATTAAATAATCCATCAGATTAAAAAGTTAAAAAGTTAAAAAA  
H Y F P L L K L I N N P S D L K K L K K

310 330 350  
CAATATTTACCTTATTAGCACATGAATTAAAATATTTTATTTTATTGTAAATATA  
Q Y L P L L A H E L K I F L F F I V N I

370 390 410  
ACAGGAGGTCACTTCTGTTTAAGCTCTTAGAAATTCAATTATTATTATTGTAT  
T G G H F S S V L S S L E I Q L L L Y

430 450 470  
ATTTTAATCAACCATATGATAATGTTATATGATATAGGACATCAAGCATATGTACAT  
I F N Q P Y D N V I Y D I G H Q A Y V H

490 510 530  
AAGATATTGACCGGAAGAAAATATTATTTCTATCATTAAGAAATAAAAAGGTATTAGT  
K I L T G R K L L F L S L R N K K G I S

550 570 590  
GGATTCTAAATATTTGAAAGTATTATGATAAAATTGGGGCTGGTCACAGTTCCACT  
G F L N I F E S I Y D K F G A G H S S T

610 630 650  
TCATTAAGTGCTATACAAGGATATTATGAAGCCGAGTGGCAAGTGAAGAATAAGAAAAA  
S L S A I Q G Y Y E A E W Q V K N K E K

670 690 710  
TATGGAAATGGAGATATAGAAATAAGTGATAACGCAAATGTCACGAATAATGAAAGGATA  
Y G N G D I E I S D N A N V T N N E R I

730 750 770  
TTTCAAAAAGGAATACACAATGATAATAATTTAACATAATTTATAATAATAATTAT  
F Q K G I H N D N N I N N N I N N N N Y

790 810 830  
ATCAATCCTTCAGATGTGGTAGGAAGAGAAAATACGAATGTACCAAATGTACGAAATGAT  
I N P S D V V G R E N T N V P N V R N D

850 870 890  
AACCATAACGTGGATAAAAGTACACATTGCTATTATAGGAGATGGTGGTTAACAGGTGGA  
N H N V D K V H I A I I G D G G L T G G

Fig. 2b      Teil 1

910 930 950  
 ATGGCATTAGAACGCTAAATTATTCATTCTGAATTCTAAAGGTTAAATTATTAT  
 M A L E A L N Y I S F L N S K I L I I Y  
 970 990 1010  
 AATGATAACGGACAAGTTCTTACCAACAAATGCCGTAAAGTATATCAGGTAATAGACCT  
 N D N G Q V S L P T N A V S I S G N R P  
 1030 1050 1070  
 ATAGGTTCTATATCAGATCATTACATTATTTGTTCTAATATAGAACAAATGCTGGT  
 I G S I S D H L H Y F V S N I E A N A G  
 1090 1110 1130  
 GATAATAAATTATCGAAAAATGCAAAAGAGAATAACATTTGAAAATTGAAATTATGAT  
 D N K L S K N A K E N N I F E N L N Y D  
 1150 1170 1190  
 TATATTGGTGTGTAATGGTAATAACAGAACAGCTCTTAAAGTATTAATAATATA  
 Y I G V V N G N N T E E L F K V L N N I  
 1210 1230 1250  
 AAAGAAAATAAATTAAAAAGAGCTACTGTTCTCATGTACGTACAAAAAAATCGAATGAT  
 K E N K L K R A T V L H V R T K K S N D  
 1270 1290 1310  
 TTTATAAATTCAAAGAGTCCAATAAGTATATTGCACTCTATAAAAGAAAATGAGATTTC  
 F I N S K S P I S I L H S I K K N E I F  
 1330 1350 1370  
 CCGTTCGATACCACTATATTAAATGAAATATTCTATAAGGAGAACAGATAGAACAGAG  
 P F D T T I N G N I H K E N K I E E E  
 1390 1410 1430  
 AAAAATGTGTCTCATCTACAAAGTATGATGTAATAAGAATAATAAAAATAATGAT  
 K N V S S S T K Y D V N N K N N K N N D  
 1450 1470 1490  
 AATAGTGAATTATAAAATATGAAGATATGTTTCAAAAGAGACGTTACAGATATATAT  
 N S E I I K Y E D M F S K E T F T D I Y  
 1510 1530 1550  
 ACAAAATGAAATGTTAAATTTAAAGAAAGATAGAAATATAATATTCTATCTCCGCT  
 T N E M L K Y L K K D R N I I F L S P A  
 1570 1590 1610  
 ATGTTAGGAGGATCAGGATTGGTAAATTAGTGAGCGTTATCCAAATAATGTATATGAT  
 M L G G S G L V K I S E R Y P N N V Y D  
 1630 1650 1670  
 GTAGGTATAGCAGAACACATTCTGTAACCTTCGAGCAGCTATGGCAATGAATAAGAAA  
 V G I A E Q H S V T F A A A M A M N K K  
 1690 1710 1730  
 TTAAAAATACAATTATGTATATATTGACCTTTACAAAGAGCATATGATCAAATTATA  
 L K I Q L C I Y S T F L Q R A Y D Q I I  
 1750 1770 1790  
 CATGATCTAATTACAAAATACCTTAAAGGTTATAATTGGAAGAAGTGGATTAGTA  
 H D L N L Q N I P L K V I I G R S G L V  
 1810 1830 1850  
 GGAGAGGATGGGGCAACACATCAAGGTATATGATTATCTTATCTGGGACACTTAAC  
 G E D G A T H Q G I Y D I S Y L G T I N

Fig. 2b Teil 2

M 06 11.99

1870 1890 1910  
AATGCATATATAATATCTCCAAGTAATCAAGTTGATTTGAAAAGAGCTCTTAGGTTGCT  
N A Y J I S P S N Q V D L K R A L R F A  
1930 1950 1970  
TATTTAGATAAGGACCATTCTGTGTATACGTATACCCAGAATGAACATATTAAGTGAT  
Y L D K D H S V Y I R I P R M N I L S D

1990 2010 2030  
AAGTACATGAAAGGATATTGAACATTACATATGAAAAATGAGAGCAAAATATCGATGTA  
K Y M K G Y L N I H M K N E S K N I D V

2050 2070 2090  
AACGTGGATATAAACGATGATGTAGATAATATAGTGAAGAATATGGACGATGATAAT  
N V D I N D D V D K Y S E E Y M D D D N

2110 2130 2150  
TTTATAAAATCGTTTATTGGAAAATCTAGAATTATTAAAATGGATAATGAAAATAATAAT  
F I K S F I G K S R I I K M D N E N N N

2170 2190 2210  
ACAAATGAACATTATTCAAGCAGAGGAGATACACAGACAAAAAAAGTTGTATC  
T N E H Y S S R G D T Q T K K K K V C I

2230 2250 2270  
TTTAACATGGGTAGTATGCTTTTAATGTAATTAATGCTATAAAAGAAATTGAAAAAGAA  
F N M G S M L F N V I N A I K E I E K E

2290 2310 2330  
CAATATATTTCACATAATTATTCTTTCAATTGTTGATATGATATTTAAATCCTTTA  
Q Y I S H N Y S F S I V D M I F L N P L

2350  
GATAAAAATATGATA  
D K N M I

Fig. 2b                    Teil 3

106 11-96

1 MKKYIYIYFF FITITINDLV INNTSKCVSI ERRKNNAYIN YGIGYNGPDN  
51 KITKSRRCKR IKLCKKDLID IGAIKKPINV AIFGSTGSIG TNALNIIREC  
101 NKİENVFNVK ALYVNKSVNE LYEQAREFLP EYLCIHDKSV YEELKELVKN  
151 IKDYKPIILC GEKGKEICSS NSIDKIVIGI DSFQGLYSTM YAIMNNKIVA  
201 LANKE SIVSA GFFLKKLLNI HKNAKIIPVD SEHSAIFQCL DNNKVLKTKC  
251 LQDNFSKINN INKIFLCSSG GPFQNLTMDE LKNVTSENAL KHPKWKMGKK  
301 ITIDSATMMN KGLEVIETHF LFDVDYNDIE VIVHKECIIH SCVEFIDKSV  
351 ISQMYYPDMQ IPILYSLTWP DRIKTNLKPL DLAQVSTLTF HKPSLEHFPC  
401 IKLAYQAGIK GNFYPTVLNA SNEIANNFL NNKIKYFDIS SIISQVLESE  
451 NSQKVSENSE DLMKQILQIH SWAKDKATDI YNKHNSS

Fig. 3a

M 06.11.99

1 DEIYKEIYEL YVERNIPPEYY ERKYFSEDIK KSVLFDIDKY NDVEFEKAIK  
51 EEFINNGVYI NNIDNTYYKK ENILIMKKIL HYFPLLKLIN NPSDLKKLKK  
101 QYLPLLAHEL KIFLFFIVNI TGGHFSSVLS SLEIQLLLY IFNQPYDNVI  
151 YDIGHQAYVH KILTGRKLLF LSLRNKKGIS GFLNIFESIY DKFGAGHSST  
201 SLSAIQGYYE AEWQVKNKEK YGNGDIEISD NANVTNNERI FQKGIHNDNN  
251 INNNINNNNY INPSDVVGRE NTNVPNVRND NHNVDKVHIA IIGDGGLTGG  
301 MALEALNYIS FLNSKILITIY NDNGQVSLPT NAVSISGNRP IGSISDHLHY  
351 FVSNIEANAG DNKLSKNAKE NNIFENLYD YIGVVNGNNT EELFKVLNNI  
401 KENKLKRATV LHVRTKKSND FINSKSPISI LHSIKKNEIF PFDTTILNGN  
451 IHKENKIEEE KNVSSSTKYD VNNKNNKNND NSEIIKYEDM FSKEFTFTDIY  
501 TNEMLKYLKK DRNIIFLSPA MLGGSGLVKI SERYPNNVYD VGIAEQHSVT  
551 FAAAMAMNKK LKIQLCIYST FLQRAYDQII HDLNLQNIPL KVIIGRSGLV  
601 GEDGATHQGI YDLSYLGTLN NAYIISPSNQ VDLKRALRFA YLDKDHHSVYI  
651 RIPRMNILSD KYMKGYLNIH MKNESKNIDV NVDINDDVDK YSEEYMDDDN  
701 FIKSFIGKSR IIKMDNENNN TNEHYSSRGD TQTKKKVCI FNMGSMLFNV  
751 INAIKEIEKE QYISHNYSFS IVDMIFLNPL DKNMI

Fig. 3b

Fig. 4a Teil 1

M 06.11.99

Hpy1 YTLWCYKDLLENPKLG---VVLNASNEVAMERFLNKEIAEGGIQTIISQALESYDRMPPKLSSLE---EVIELDKEVR  
Aaeo PK--AID-LAKWAGFMGGVYIPVVLGADEEPVNIFLNKRIIGFLDIVDILIEQALS---EVNIXDPOSVREIIEAVERGR  
Mtub EP--AVI-LAROAGVAGCCMTAVYNAANEZARAIFIAGRIGFPAIVGIIADVLHAADQRAVEPATVD---DVLDAQRVAR  
Bsub ER--C1Q-EAFESGRIGGTMTPTVLNAANEVAVAAFLAGKTFPLAIECDIEKA-LTRQQLLKPSWR--TF--KQVTK  
Syne YP--C1Q-EPYAGRAGGAMPAPVLAANECAVAFIQLQKISLELDIPRLIEKTCDDLYVGQNTASPDLE--TILAAQDWAR  
Paer EP--CDR-ASCAAETGGSAPAMLNAAANEVAVAAFIERHEDRSIDIAVIIEDV--LNREAVTAVESID--QVLAADREAR  
Hinf YP--NUK-LAIDAFAAACQYATTAAANNAANEIAVQAFDROQIGMDIAKINSKT--IERISPYTQIHD--DVLIEIDAQAR  
Ecol YP--CDK-LAMSAFEGOAAATTALNAANEITVAAFLAQQIRETDIAALNSV--LEKMDMREPQCVD--DVLISVDANAR  
Pfal EP--C1K-EAYOAGINGNFYPTVLNASNEIANNIFLANKIKMFDIISIIISQVLESFNSOKVSENSEDILMROHILQIHSWAK

---

Hpy1 ERFKNVAGV-----  
Aaeo QKVREIYERKYAGKG-----  
Mtub ERAQRAVSGMASVALIASTAKPGAAAGRHASTLERS  
Bsub IPGDTSIQYSHKVVC-----  
Syne ---RTVLENSACVATRP-----  
Paer SVAGQWLTREAG-----  
Hinf EIA-KTLLRE-----  
Ecol EVARKEVMRLLAS-----  
Pfal DKATDIYNKHNS-----

Fig. 4a

Teil 2

# Montana

Pfal	
Bpyl	
Mtub	
Bsub	
Syne	
Paer	
Ecol	
Hinf	
Rcap	
Osat	
Atha	MASSAFAPSYIITKGGLSTDSCCKTSLSSSRSLVTDLPS PCLK
Mpip	MASSCGVIKSSFLP --- SLHSEDSTFLSRAP --- TSLPLKNHKLNVVAALQDSSNDVVPSCGRLSRPKSR --- ALSFT

```

Pfal -----DIKKNKKQYIPLIAPAEKLIFLFFFVNITGGHFTSSVLESSLHOLLELYIFNOFYVNVYI
Hpy1 -----MILQNKTFDLNPNDIAGLELVCQTLRNRILLEVVSANGGHLSSSLCWEVLTIVGMALEDCQKNPFF
Mtub -----MLOQIRGPADLQHISQAQLEPAAEIREFLIEHKVATGGHILGPNGWELTLAHLRVEDSPRLPEI
Bsub -----MDLILSIQDPSFLKMSIDELEKNSIDEIRQFLITSLSASGGHIGPGLGWEVLTVALKPFENSPKDKLILW
Syne -----MHSIKELTHPNEILKGISIRELEEVSRQIREKHLQTATSGGHLGPGLGWEVLTVALYSTLDDKARVIVL
Paer LHEIPRERPATPLIILDRASSPAELRRIGEADLSTLADELRLQYLLTVGQTTGGHFGAGLSSWEVLTVALKIVFDTPOELRLW
Ecol -----MSFDIAKPTLALVDSTQELFLIPKESLPLKCDLRLRYILDSVSRSSSGHEASCLGAGNEVLTVALKIVYNTFFPOLIWL
Hinf -----MTNNQNNYPLISLINSPEDLFLIUNKDQIPOLCOELRAYLLESVSQTSGHLASGLSWEVLTVALKIVYKTFEPOLIWL
Rcap -----MSATPSRTPHLDKVTGPADLRAKSIAADLTAASEVREIIVEVVSQGGHILGSSLGWEVLTVALKAVENSPGKELIWL
Osat -----NYPILHMKNISLKELOQIAADELRSVDWIFEVSKTGGHILGSSLGWEVLTVALHYVENTPODKILWL
Atha GEYYSNRPP-TPLIDTINYPIHMKNISVKEELKOLSDELRSDVIFNVSKTGGHILGSSLGWEVLTVALHYIENTPODKILWL
Mpip GE-----KPP-IPILDTINYPNEMKNISVVEELANADELREEIIVYTVSKTGGHILSSSLGWEVLTVALHYVENTPODKILWL

```

Pfal	IGHQAYVHKILTGRKLLFLSLRNQGSGRLNIFESIYDKFGAGHSSTSLSA1QGKVEAEWQVKKKEKYGNGLDEISDN
H pyl	TSHQAYVHKLLTGRFESFSTLROFNGLSGFTKPSSEAYDIFLAGHSSTSVSIGVGVAAAF
Mtub	TSHQAYVHKMLTGRSQDFATLRCGGISGVPSSRAESEBDWESSHASAALSIAALGLAAAF
Bsub	VGHQSYVHKLLTGRKPFATLROQKGLCPKPSSEBDWETGHSSSTSLSGAMCMAAAR
Syne	VGHQAYVHKMLTGRYHDFTLROQDGVAGYLKRSSESRDHFEGAGHASTSISAGLGMALAR
Paer	VGHQAYVHKILTERRELMTLROQGLAAPPRAESEYDIFGVGHSSSTSISAGLGMALAR
Ecol	VGHQAYVHKILTGRDKIGTIROQCGUHPFPWRGESEIDVLSVGHSSSTSISAGIGIAAVAA
Hinf	VGHQAYVHKILTGRREQMTIROQDGIHPFPWRGESEIDVLSVGHSSSTSISAGLGIAVAA
Rcap	VGHQAYVHKILTGRRSRMITLROAGGISGFPKPSSESPHDAFGAGHSSTSISAGLCAVGR
Osat	VGHQSYVHKILTGRDKMFTMROQNGLSGFTKRSSEYDIFGTGHSSTTISAGLGMAVGR
Atha	VGHQSYVHKILTGRGRMFTMROQNGLSGFTKRGSEEDCFTGHSSTTISAGLGMAVGR
Mpip	VGHQAYVHKILTGRRARMETIROTEGLAGEPKRDESAFDAGAGHSSTSISAGLGMALAR

Pfal	NVTNNERIFOKGIHNDNNNNNNNNNNYINPS	VVGRENTNVPNVRNDNHNVDKVHIIAI	IGGGGLTGG-ALEALNYISFL
H pyl		CLKQALGMP	IAALLGDCSISACIYEALNLG-
Mtub		ELTGHRNRHVV	WAVVVGDAALTGG-CWBALNNIA-
Bsub		DIKGT-DEYI	IPPIIGDGALTGG-ALEALNHICD-
Syne		DAKGE-DFKV	VSIIIGDGALTGG-ALEALNHACII
Paer		RLQGK-ERKS	WAVVIGDGALTAGMATEALNHASIEV
Ecol		EKEGK-NRRT	VCVIVGDGAITAGMATEAMNHACDI
Hinf		ERENA-GRKT	VCVIVGDGAITAGMATEALNHAGAL
Rcap		ELGQP-VGDT	IAIIIGDGCSITAGMATEALNHAGII
Osat		DLKGG-KNNV	WAVVIGDGAMTAGOAYEAMNNAGYI
Atha		DLKGK-NNNV	WAVVIGDGAMTAGOAYEAMNNAGYI
Mpip		DLLQK-NNEV	ISVIVGDGAMTAGOAYEALNNAGYI

Fig. 4b Teil 1

M 06.11.96

Pfal	NSK-ILIIIPNDNGQVSLPTNAVSISGNRPGCSISDEHRYFVSNIEANAGDNKESKNAKE-----
Hpyl	RKYPMMIILNDN-EMSI-----STPIGALKAL-----S01MKGPFYQSFRSKVKKILSTLP-----SVNYLASRPE
Mtub	SRRPVIIVVNDNGR-----SYAPTIIGGVADEL-----ATURLQPAYEQALETGRDILVRAVPLVGGLWFRFLHSVKA
Bsub	EKKD-MIVILNDN-EMSI-----APNVGAHSM-----GR0RTAGKYQWKRDSLEYDFKKNIPAVGGKLAATAERVKD
Syne	PHTRLMVIILNDN-EMSI-----SPNVGAISRYL-----NFRVRLSSPMQFLTDNLEQIKAHLPPFGDSLTPFEMERVKE
Paer	DA-DMLVIILNDN-DMSI-----SHNVGGISNYL-----AKILSSRTYSSMREGSKRVLSRLP-----GAWELARRTEE
Ecol	RP-DMLVIILNDN-EMSI-----SENVGAIINNL-----AQLSGKLYSSUREGGKRWFGCP-----PIKELLARTEE
Hinf	HT-DMLVIILNDN-EMSI-----SENVGAIINNL-----ARIIFSGSLYSLTIERDGSKRILDKVP-----PIKNFMKTEE
Rcap	KS-RMIVILNDN-DMSI-----APPVGAIQHYL-----NTIAROAPFAAEKAAGETIEMELP-----GPVRDGARRARQ
Osat	DS-DMIVILNDN-KOVS1PTATLD-GPAPPVGAISSAL-----SRIQSSRPLREIREVAKGVTKQIG-----GSVHELAALKDE
Atha	DS-DMIVILNDN-KOVS1PTATLD-GPSPPVGAISSAL-----SRIQSNPALREIREVAKGVTKQIG-----GPMHQLAAKVDV
Mpip	DS-NLIIVLNDN-KOVS1PTATVD-GPAPPVGALSKAL-----TKLQASRKFQREREAAKSMYTKQIG-----APAHIELASKLTQ

Pfal	-----NNIFENLNKDYIGVUNGNNTTEELFKVILNNIKENKLKRATVILHVTIKSNDFINSKSPISILHSIKKNEIP
Hpyl	SEK-----LITPGVBFEEELGKINYIGPINGHDLASIETLKLAKELKE-----PVLIAQCTK
Mtub	GIKDSLSPQ-----ILFTADLGLR-YVGPGDGHDERAVEVALRSAR-----REGAPVTVHVVTEK
Bsub	SLKIMLVS-----GKFEELGFAYLGPGDGHSYHELIENLQYAK-----KTKGPVLLHVTIK
Syne	GMKPLVVPKVGAVIEELGKTYEGPIDIQHSLQEELDTFKQAE-----KVPGPVVEVHVTIK
Paer	YAKG-MLVP-GTLEELGKTYIGPIDIQHDLPTLVATLRNM-RDK-----GPQFLHVVTIK
Ecol	HKKG-MVVP-GTLEELGKTYIGPVDGHDLVGLLTTLNMRDLK-----GPQFLHIVVTIK
Hinf	HMKGVMFSPESTLFEELGKTYIGPVDGHNIDELEVATLTNMRNLK-----GPQFLHIKTNIK
Rcap	MVTAMPG-----GATLFEELGKTYIGPVDGHOMAELVETLR-VTRARASGPVLIHVVTIK
Osat	IARGMISGSGSTLFEELGKTYIGPVDGHNIDDLITILREVKSTKTTGPVLIHVVTIK
Atha	IARGMISGTGSSLFEELGKTYIGPVDGHNIDDLVAILKEVKSTRTTGPVLIHVVTIK
Mpip	YVKGAGKPGASLFEELGKTYIGPVDGHNVEDLIVYIFKKVKEEMPAPGPVLIHIITEK

Pfal	PFDTTILNGNIHKENKIEEEKNVSSSTKVDVNNNNNNNDNSEIIKYEDMFSKETFTDITYTNEMLKYLKKDRNIIELISPA
Hpyl	-----CKGYKIAE-GRYERKWHGVPFEDLTC-LSKKSNSAI-----LSFTEAYSNTLLELAKRDERIVGVVTA
Mtub	-----GMGYPPAEADQAEQMHSVPIDPATCQA-----TKVAG-----PGWTATESDALIGYAQKRRDIVAITAA
Bsub	-----CKGYKPAETDTIGTWHTGPYKINTCD-FVKPKAAA-----PSWSGLVSGTVQRMAREDGRIVAITPA
Syne	-----CKGYDLAERDQVG-YHAQSPENLSTICKAYPSSKPKP-----PSYSKVEAHTLTTIARENPNIVGITAA
Paer	-----GN--APAELDPIG-YHAITKLE-AECSAP-KKTGG-----PRYSSVEGQWLCDMAAQDARLLGITPA
Ecol	-----GRGYEPAEKDPIF-HAVPKFDPSSGCLP-KSSGGL-----PSYSKIEGDWLCEATAKDNIMMAITPA
Hinf	-----GRGYAPAEKDPIG-FHGVPKFDPISGELP-KNNSK-----PTYSKIEGDWLCEAEDAKIIGITPA
Rcap	-----GRGYAPAEKAEDK-LHGVSKEFIDETGKQK-KSIPNA-----PNYDAVEGERLTEEAAARDOAIVAVTAA
Osat	-----GRGYPYAAERADDK-YHGVVKEDPATGQF-KTTNET-----LSYTNYEARALLAEEAEDNRVVAIHA
Atha	-----GRGYPYAAERADDK-YHGVVKEDPATGQF-KTTNET-----QSYTPTYEALVAEAEVVKDQVVAIHA
Mpip	-----GNGYPPAEIAADK-MHGVVKEADTKGOM-KTKNKT-----KSVIQYEAESELVAEAEEDDKIVAIHA

Pfal	MLGGSGLVKJISERYPNVYDVGIAEQHSVTEAAAMANKKLKIQLCITYSTFLQRAYDQIITHDLNQNLPLVIIIGRSGLV
Hpyl	MPSGTGLDKLIDAYPLRFDVIAEAEQHALTSSSAMAKEG-FKPFVSIYSTFLQRAYDLSIVHEDCISSLPLKLAIDRAGIV
Mtub	MFGPTGLTAFQQRFPORLFDVGIAEAEQHAMTSAGLAMGG-LHPVVVAYISTFLNRAFDQIMDVADHNLPVIMVDRAGIT
Bsub	MFGVGSKLEGEFAKEFPDRMFDVGIAEAEQHATVAAAMAMOC-MKPFIAIYSTFLQRAYDQVHEDCQDNANVFIGIDRAGLV
Syne	MAITGTGLDKLQAKIPKQYIDVGIAEAEQHATVAAAGMACEG-IRPVVAYISTFLQRAYDQIITHDVQIQNLPVIFCIDLDRAGIV
Paer	MKEGSDLVAEAEQHATVAAAGMACEG-MKPVVAYISTFLQRAYDQIITHDVWQELPLVIFCIDLDRAGIV
Ecol	MREGSGMVEFSRKKPDRYFDVIAEAEQHATVAAAGLAIIGG-YKPIVVAIYSTFLQRAYDQVHEDVQIQNLPVIFCIDLDRAGIV
Hinf	MREGSGMVEFSQRFPKQYFDVIAEAEQHATVAAAGLAIIGG-YKPVVVAIYSTFLQRAYDQVHEDVQIQNLPVIFCIDLDRAGIV
Rcap	MPTGTGLDIMQKRFPRRVFDVGIAEAEQHATVAAAGMAAAG-LKPFIALYSSFVQRGQYDQLVHDVALQNLPVRLVIFCIDLDRAGIV
Osat	MGGGTGLNYFLRRFPNRCFDVGIAEAEQHATVAAAGLACRG-LKPFCAIYSSFLQRGQYDQVHVDVLQNLPVRFMMDRAGLV
Atha	MGGGTGLNLIFQKOFEDRCFDVGIAEAEQHATVAAAGLACRG-LKPFCAIYSSFMQRGQYDQVHVDVLQNLPVRFMMDRAGLV
Mpip	MGGGTGLNIFQKOFEDRCFDVGIAEAEQHATVAAAGMAAAG-LKPFCAIYSSFLQRGQYDQVHVDVLQNLPVRFMMDRAGLV

Pfal	GEDGATHOGIYDLSYLGDNNAAYLISSESNQVDLKRATRDAYLDRDHHSVYIPIPRMNILSDKYMKGYLNIEHMQNESKNIDV
Hpyl	GEDGETHOGIYDLSYLRSPNMVIFAPRDNETLKNARBDANEHDSSPCAERYPR
Mtub	CSDGASHNGWDLSYLGIVPGIRVAAPRDAATRLEEGALDVDDCPTALRFPK
Bsub	CADGERTHOGVFDIAFMREHIPNLMVLFENDENEQDMVITALSYDEGPIALRFPK
Syne	CADGERTHOGYDIAYLRCIPNLVLMVLPKDEAEIQLQMLVTCGVNTGGJALANRYPR
Paer	CADGERTHAGSFDISYLRCIPGMVLMVPSDEDELRLKLTTCYGLF-DGPAAVRYPR
Ecol	CADGATHOGAFLDSYLRCPMVMPSDENECROMLYTCYHYNDGPAVRYPR
Hinf	CADGATHOGAFLDISFMRCIPNMHMPSDENECROMLYTCYQCGK-PAAVRYPR
Rcap	CADGATHACAFDVS-LANLPNFTVMAADEAEELCMBVTAAGADSGPIALRYPR
Osat	CADGERTHCCAFDVTYMACLPNMVMVMAPSDEAEELCMBVATAAAIDDRPSCBRYPR
Atha	CADGERTHCCAFDVTMFMACLPNMIVMAPSDEADLFNMVATAVAIDDRPSCBRYPR
Mpip	CADGERTHCCAFDTTYMACLPNMVMVMAPSDEAEELMMIATAAIIDDRPSCBRYPR

Pfal	NVDINDDVVKYSEEYMDDDNFIKSICKSRIIIRMDNENNNTNEHYSSRGDTQTKKKVCI	FNMSMDSLIFNVNVI
Hpy1	-CSFALKCGVFEPGFGV-----IQCSEILLLKEK	-EILLIGVCGVGRAHLVQLALKK
Mtub	-CD-V-CEDIASALERRGGDVVLAAPADGLNH	-DVLLVAIAPAPMADAVAKRLHQ
Bsub	-CNGL-CVK-MDE-QLKTIPICTWEVLRPGN	-DAVILTEETTTEKMAAEEELQK
Syne	-CNGI-CVPLMEE-GWEPLEIICKAKIILRSGD	-DVLLIGYCSAVYPAQTAELLEHH
Paer	-CSPG-NHPIDPDLO-PVEICKGVVRGG	-RVALILVFGVQIAALMKA
Ecol	-CNAV-CVKLTP-LE-KIPICKGIVKRRGE	-KIAALIENGTCIMPEAKVA
Hinf	-CNAV-CVKLTP-LE-MIPICKSRIIIRKGQ	-KIAALIENGTCILPSAEL
Rcap	-CEGR-CVEMP--ERGEVIEIICKGRVMTG	-EVALLISFCARIAQAAKAAEMLAE
Osat	-CNGI-CVPLPPNYKGVPVIEVKGRVILLEG	-RVALIGYCSAVYQCDAAASLVERH
Atha	-CNGI-CVALPPGNKGVPVIEICKGRVILKEG	-RVALIGYCSAVYQSCGAAVMLEER
Mrip	-CNGI-CVALPSNNKGTPVIEICKGRVILKEGS	-RVALIGCFTIVONCMAANLLEQH

Pfal	QYISHNYSHSTVDLIELNPLDKRNM
Hpyl	-----NIECALUDIREFLKPLDPNL-----SAIVAPYQKLYVFSINYKLG-----VSAILEF-----SEQNLK-----PVKSFR-----IDEFIMEG
Mtub	-----GIGTVVLDERRWLPVSDG-----VRELAVQHKL-----LVTLEDNGVAGGACSAVSAALR-----RAEIDVPCRDVG-----LPQE-----FYEEA
Bsub	-----GLSVRVVUNARFLIKPIDENMMKSILKEGLP-----ILTIEAVL-----EGGFCSSILEFAHDQGEYH-----TPIDRM-----CIPDRFIEHG
Syne	-----GIEATVUNARFKPLDTE-----LILPLAERIGK-----VVTMEEG-----CLMGC-----CSAVAEALMDNN-----VL-----VPLKRLG-----VPDILVDBA
Paer	-----SLDATVVD-----R-----FVVKPLDEALV-----RELAGSHEI-----LVTIEENAV-----GGAGSAVGE-----FLASEGL-----EVPLLQLC-----LPDYYVEHA
Ecol	-----SINA-----TLVD-----R-----FVVKPLDEALI-----LEMAASHEA-----LVTVEENAI-----SGAGSGV-----NEVLMahrk-----FV-----FVNLIG-----LPDFFTIPOG
Hinf	-----KINA-----TVVD-----R-----FVVKPIDI-----EMINV-----LAQTHD-----LVTLE-----ENAI-----CGGACSAV-----AEV-----LNSSGK-----STALLQLC-----LPDyFIP-----OA
Rcap	-----GV-----STTVADARFCRPLD-----TLDLDR-----LIEG-----HAAL-----LITTLE-----QGAM-----GG-----G-----CAMV-----LHYI-----ARTG-----Q-----OLEK-----GRA-----IRTM-----LPDCY-----ID-----HG
Osat	-----GU-----KTVADARFC-----KPLD-----TLDLIR-----RJ-----A-----SSHE-----V-----L-----T-----V-----E-----EGSI-----GG-----G-----G-----SHE-----VAQF-----MAL-----DGLL-----D-----G-----K-----L-----KWRP-----
Atha	-----GL-----N-----TVADARFC-----KPLD-----RALI-----RS-----IA-----K-----S-----HE-----V-----L-----T-----V-----E-----EGSI-----GG-----G-----G-----SHE-----VV-----QF-----AL-----D-----G-----L-----D-----G-----K-----L-----KWRP-----PMV-----LPDRY-----ID-----HG
Moip	-----G-----S-----T-----VADARFC-----KPLD-----G-----D-----L-----IKR-----V-----Q-----E-----HE-----V-----L-----T-----V-----E-----EGSI-----GG-----F-----SA-----I-----HE-----I-----S-----LN-----G-----L-----D-----G-----NL-----K-----W-----R-----PMV-----LPDRY-----ID-----HG

Pfal	-----
Hpyl	NTALVEKSIQLGTDOTESITDAILKDLGQER-----
Mtub	SRSEVLADILGLTDQDVARRITGWVAALGTGVCAASDAIPEHLD-----
Bsub	SVTALLEEIGLTQOQVANRIRL-LMPPKTHKGIGS-----
Syne	TPEQSTVDIIGLTPQMAQNIMASLFKTE TE SVVAPGVS-----
Paer	KPSEMLAECGLDAAGIEKAVRQRQLDRQ-----
Ecol	TQEEMRAEIGLDAAGIEAKIKAWLA-----
Hinf	TQEALADIGLDTKGIEEKILNFIAKQGNL-----
Rcap	SPEEMYAWAGLTANDIIRD TALA-AARPSKSVRIVHSA-----
Osat	-----
Atha	APADQLAERAGLMPSHIAATALNLIGAPREALE-----
Mpip	AQSDQIEEAGLSPKHIAGTVVSLIGGGKDSLHLINNL-----

Fig. 4b Teil 3

M 06.11.99

Dosis [mg/kg]	Parasitemie [%]	
	Formyl	Acetyl
300	0.0	0.0
30	0.0	0.0
10	0.0	0.0
5	0.06 ± 0.17	0.0
2	11.7 ± 16.5	0.86 ± 0.44
Kontrolle	65.9 ± 19.1	65.9 ± 19.1

Fig. 5

M 06.11.99

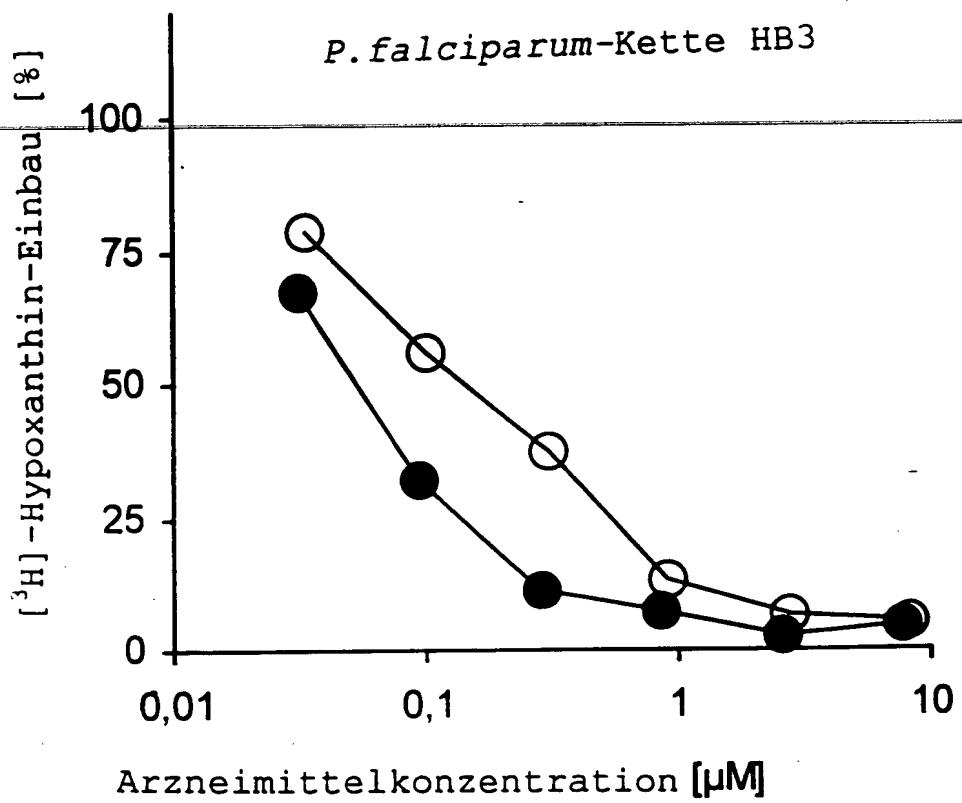


Fig. 6a

M 06 11-99

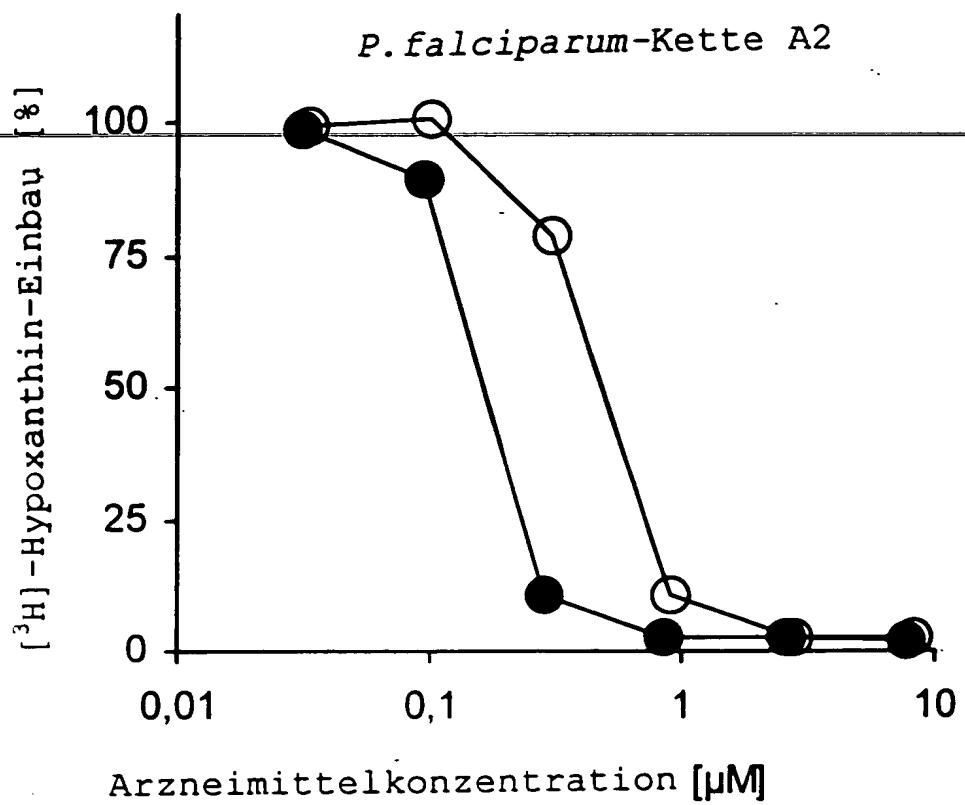


Fig. 6b

M 06.11.99

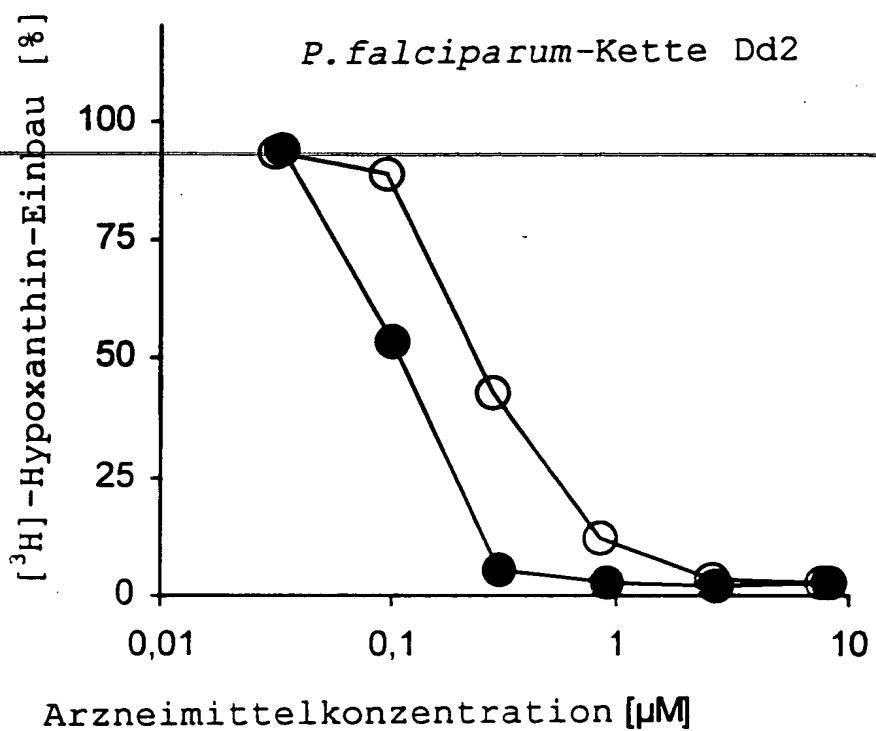
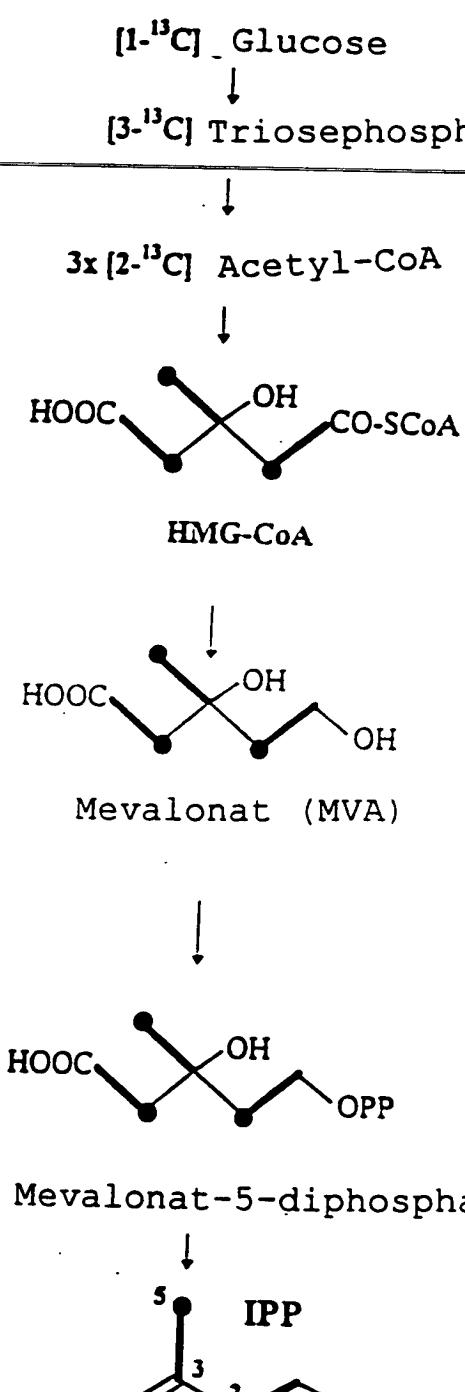


Fig. 6c

M 08.11.99

Klassischer Acetat/  
Mevalonat-Pathway



höhere Pflanzen (Cytoplasmen),  
Tiere, Pilze; Eubakterien

Fig. 7

Alternativer DOX-P  
Pathway

